

Lipidnanopartikel als Arzneistoffträger für die pulmonale Applikation

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Matthias Ebrahimi-Nassimi

aus Halberstadt

1. Referentin:	Professor Dr. Christel C. Müller-Goymann
2. Referent:	Privatdozent Dr. Armin Braun
eingereicht am:	28.06.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am:	20.08.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Nassimi, M., Schleh, C., Lauenstein, H.D., Hussein, R., Lübbers, K., Pohlmann, G., Switalla, S., Sewald, K., Müller, M., Krug, N., Braun, A., Müller-Goymann C.C. Low cytotoxicity of solid lipid nanoparticles in in vitro und ex vivo lung models.

Inhalation Toxicology 21 (S1): 104-109 (2009).

Nassimi, M., Schleh, C., Lauenstein, H.D., Hussein, R., Koch, W., Pohlmann, G., Krug, N., Sewald, K., Braun, A., Müller-Goymann C.C. A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a drug delivery system for the lung.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 75 (2): 107-116 (2010).

Tagungsbeiträge

Nassimi, M., Braun, A., Müller-Goymann, C.C.: Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles in the lung. (Vortrag) 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spanien (2008).

Nassimi, M., Schleh, C., Pohlmann, G., Müller, M., Krug, N., Müller-Goymann, C., Braun, A.: Characterization of the tolerable dose of solid lipid nanoparticles as a drug delivery system in the lung. (Poster) American Thoracic Society (ATS) International Conference, Toronto, Kanada (2008).

Nassimi, M., Schleh, C., Sewald, K., Pohlmann, G., Krug, N., Müller-Goymann, C., Braun, A.: Cytotoxicity of inhalational drug delivery of solid lipid nanoparticles. (Poster) 11th International Inhalation Symposium (INIS), Hannover, Deutschland (2008).

Nassimi, M., Hussein, R., Krug, N., Braun, A., Müller-Goymann, C.: Evaluation of the toxicological impact of nebulized solid lipid nanoparticles in a 16-day mouse study. (Poster) 1st Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Heidelberg, Deutschland (2009).

Nassimi, M., Schleh, C., Hussein, R., Pohlmann, G., Krug, N., Müller-Goymann, C., Braun, A.: Solid lipid nanoparticle are a promising inhalational drug delivery system for the lung – a toxicological point of view. (Poster) American Thoracic Society (ATS) International Conference, San Diego, USA (2009).

Nassimi, M., Schleh, C., Hussein, R., Pohlmann, G., Krug, N., Müller-Goymann, C., Braun, A.: Solid lipid nanoparticle a promising inhalational drug delivery system for the lung show low cytotoxicity and inflammation in vivo. (Poster) 2nd Pharmaceutical Sciences Fair and Exhibition, Nizza, Frankreich (2009).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Allgemeiner Teil	2
2.1	Anatomie und Funktion der Lunge.....	2
2.2	Vergleich der humanen und murinen Lunge	3
2.3	Die Lunge als Eintrittspforte für lokale und systemische Arzneitherapien	5
2.4	Pulmonaler Applikationsweg zur lokalen Behandlung von Atemwegs- erkrankungen	7
2.4.1	Asthmathherapie	7
2.4.2	Therapie der COPD	9
2.4.3	Inhalative Antiinfektiva	9
2.4.4	Inhalative Arzneitherapie bei Lungenkrebs	10
2.4.5	Vakzinierung	10
2.5	Pulmonaler Applikationsweg zur systemischen Behandlung von Erkrankungen	11
2.5.1	Schmerztherapie	11
2.5.2	Osteoporose	11
2.5.3	Sexuelle Dysfunktion	12
2.5.4	Diabetes – inhalierbares Insulin	12
2.6	Pulmonale Arzneistoffträgersysteme	14
2.6.1	Liposomen	14
2.6.2	Polymere Mikro- und Nanopartikel.....	15
2.6.3	Wässrige und nichtwässrige Lösungen und Suspensionen	16
2.6.4	Mizellare Lösungen und Mikroemulsionen	17
2.6.5	Feste Lipidnanopartikel	17

2.7 Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln	19
2.7.1 Endozytose (allgemein)	19
2.8 Toxizität von Nanopartikeln	21
2.8.1 Toxizitätsuntersuchungen	24
3 Material und Methoden	27
3.1 Herstellung	27
3.1.1 Herstellung der arzneistofffreien Lipidmatrix	27
3.1.2 Herstellung der arzneistoffhaltigen Lipidmatrix	28
3.1.3 Herstellung der arzneistofffreien Nanosuspension.....	28
3.1.4 Herstellung der arzneistoffhaltigen Nanosuspension	29
3.1.5 Herstellung der fluoreszenzfarbstoffmarkierten Nanosuspension	30
3.2 Sterilisierung der Nanosuspensionen	31
3.3 Physikochemische Untersuchungen.....	32
3.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	32
3.3.2 Zetapotenzial (Laser-Doppler-Anemometrie).....	33
3.3.3 Polarisationsmikroskopie	34
3.3.4 Röntgendiffraktometrie	34
3.3.4.1 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD).....	35
3.3.4.2 Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (SAXD).....	35
3.3.5 Fluorimetrische Bestimmung der Inkorporationseffizienz.....	36
3.3.6 Bestimmung der Arzneistoffbeladungsrate	37
3.4 <i>In-vitro</i>-Untersuchungen	38
3.4.1 A549-Zellkultur.....	38
3.4.2 RAW-Zellkultur.....	39
3.4.3 Isolation und Kultivierung von Alveolarmakrophagen (AM).....	40

3.4.4	Gewinnung von Knochenmark generierten dendritischen Zellen	41
3.4.5	Vitalitätsmessungen	43
3.4.5.1	MTT-Test	43
3.4.5.2	Neutralrot-Test	45
3.4.6	Untersuchungen der SLN-Aufnahme in Zellen mittels konfokaler Mikroskopie	46
3.5	<i>Ex-vivo</i>-Untersuchungen	47
3.5.1	Präzisionslungenschnitte	47
3.5.2	Exposition der PCLS mit den SLN	49
3.5.3	WST-Vitalitätstest	50
3.5.4	Lebend/Tot-Vitalitätsfärbung	51
3.5.5	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	52
3.5.6	Quantitative 3D-Bildanalyse	53
3.6	<i>In-vivo</i>-Untersuchungen	54
3.6.1	Haltung der Versuchstiere	54
3.6.2	Aerosolgenerierung und Exposition	54
3.6.2.1	Aerosolgenerierung:	56
3.6.2.2	Aerosolcharakterisierung:	56
3.6.2.3	Studiendesign der inhalativen Toxizitätsstudie	58
3.6.2.4	Gruppeneinteilung und Behandlung der Versuchstiere	59
3.6.2.5	Exposition	60
3.6.3	Sektion/Aufarbeitung	60
3.6.4	Mikroskopische Zelldifferenzierung nach Pappenheim	62
3.6.5	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität	63

3.6.6	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	64
3.6.7	Histopathologische Begutachtung ausgewählter Organe	65
3.6.8	Statistische Auswertung	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Evaluierung des zytotoxischen und inflammatorischen Potenzials der SLN	67
4.1.1	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen	67
4.1.1.1	Bestimmung des zytotoxischen Potenzials	67
4.1.1.2	Bestimmung des inflammatorischen Potenzials	69
4.1.2	<i>Ex-vivo</i> -Untersuchungen	70
4.1.2.1	Bestimmung des zytotoxischen Potenzials	70
4.1.2.2	Bestimmung des inflammatorischen Potenzials	72
4.1.3	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen	75
4.1.3.1	Bestimmung des zytotoxischen Potenzials	75
4.1.3.2	Bestimmung des inflammatorischen Potenzials	78
4.2	Arzneistoffbeladung und Charakterisierung der arzneistoffhaltigen Lipidmatrix und der Nanosuspensionen	89
4.2.1	Herstellung und Charakterisierung der arzneistoffhaltigen Lipidmatrix .	89
4.2.1.1	Polarisationsmikroskopische Untersuchungen dexamethasonhaltiger LM	89
4.2.1.2	Röntgenuntersuchungen dexamethasonhaltiger LM	91
4.2.2	Charakterisierung der arzneistoffhaltigen Nanosuspension	93
4.2.2.1	Polarisationsmikroskopische Untersuchungen dexamethasonhaltiger Nanosuspensionen	93
4.2.2.2	Röntgenuntersuchungen dexamethasonhaltiger Nanosuspensionen	94
4.2.2.3	Untersuchungen zur Arzneistoffbeladungsrate dexamethason-haltiger Nanosuspensionen	94
4.3	Partikelcharakterisierungen	96

4.3.1	Partikelcharakterisierung nach Farbstoffmarkierung	96
4.3.2	Partikelcharakterisierung nach Dexamethason-Beladung	97
4.3.3	Partikelcharakterisierung nach Gammastrahlen-Sterilisation.....	97
4.3.4	Partikelcharakterisierung nach verschiedenen Lagerungszeitpunkten .	98
4.3.5	Partikelcharakterisierung bei Variation des Homogenisators	99
4.3.6	Partikelcharakterisierung nach Resuspendierung des Aerosols	100
4.4	Aufnahmeuntersuchungen der Nanosuspensionen mit verschiedenen Zellen und nach Aerosolisierung	101
4.4.1	Bestimmung der Inkorporierungseffizienz der Farbstoffe.....	101
4.4.2	Aufnahmeuntersuchungen der markierten SLN	102
4.4.2.1	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen mit Zelllinien	102
4.4.2.2	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen mit Primärzellen.....	104
4.4.2.3	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen mit isolierten Lymphknoten.....	107
5	Diskussion	108
5.1	Charakterisierung des toxischen und inflammatorischen Potenzials der SLN ..	108
5.2	Aufnahme der SLN.....	111
5.3	Arzneistoffbeladung.....	112
6	Zusammenfassung	114
7	Anhang	115
7.1	Literaturverzeichnis	115
7.2	Abkürzungsverzeichnis	134
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	137
7.4	Tabellenverzeichnis.....	139
7.5	Weitere Veröffentlichungen	140
7.6	Danksagung.....	141
7.7	Lebenslauf	142

1 Einleitung und Zielsetzung

Mit der Entwicklung von kolloiden Arzneistoffträgersystemen wird ein möglichst effektiver, kontrollierter Arzneistofftransport in einer optimalen Geschwindigkeit an den Wirkort angestrebt. Zunehmendes Interesse finden in diesem Zusammenhang Nanopartikel, die als feste Partikel in einem Größenbereich von 1-1000 nm definiert sind, für pharmazeutische Zwecke bioabbaubar sein müssen und in denen Arzneistoffe oder andere biologisch aktive Materialien in gelöster, eingeschlossener oder verkapselter Form enthalten oder an die Oberfläche gebunden sind. Da Nanopartikel aus unterschiedlichen Materialien bestehen können, sind keine allgemeingültigen Aussagen zum Gefährdungspotenzial möglich. Dieses ist einerseits von der Applikationsroute und andererseits vom Material selbst abhängig.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das toxische Potential von Nanopartikeln zur Inhalation, bestehend aus Sojalecithin und Hartfett, mittels aufeinander aufbauenden Toxizitätsuntersuchungen zu charakterisieren, um für nachfolgende *In-vivo*-Studien mit inkorporierten Arzneistoffen Aussagen über die therapeutische Breite des Vehikels treffen zu können.

Um einen Einblick in das Schicksal der Nanopartikel nach Inhalation zu bekommen, sollten Aufnahmeexperimente mit Zellkulturen durchgeführt werden. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung von Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen, da diese Zelltypen als phagozytierende Zellen immunmodulierende Wirkstoffe in den Lymphknoten transportieren können und somit wichtige Zielzellen bei der Entwicklung von Arzneistoffträgersystemen darstellen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war schließlich die Beladung der Nanopartikel mit einem Modell-Arzneistoff und deren physikochemische Charakterisierung. Durch die gewonnenen Daten sollten unter anderem die Stabilität bei Sterilisation sowie die Beladungskapazität ermittelt werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Anatomie und Funktion der Lunge

Die Lunge kann in einen luftführenden und einen respiratorischen Teil eingeteilt werden. Der luftführende Teil besteht aus 16 Verzweigungsgenerationen an Atemwegen einschließlich der Trachea. Diese nehmen eine Reihe wichtiger Funktionen wahr, die der Aufbereitung der Atemluft dienen. Die großen Atemwege haben ein Volumen von etwa 50 ml und eine Oberfläche von 290 cm², die kleinen Atemwege ein Volumen von 4.500 ml und eine Oberfläche von 140 m² [1]. Durch die Trachea (Lufröhre) trennt sich der luftführende Teil der Lunge am Larynx (Kehlkopf) vom gemeinsamen Weg von Luft und Speise. Sie teilt sich in Höhe des 5. Brustwirbels in die beiden Stammbronchien, die schräg abwärts gerichtet beiderseits am Lungenhilus jeweils in einen Lungenflügel eintreten (Abb. 1). Die sich immer weiter fortsetzende Verzweigung der Bronchien geht mit einer Lumenverengung einher. Die kleineren Bronchien gabeln sich mehrfach in die Bronchioli, die sich erneut aufspalten und in die Ductus alveolares (Alveolargänge) münden. Das Bronchialsystem als luftführendes System endet schließlich in den Alveolen (Lungenbläschen). Der Azinus ist definiert als Einheit bestehend aus den respiratorischen Bronchiolen, Alveolargängen und Alveolarsäcken. Die Azini bilden somit den respiratorischen Teil der Lunge.

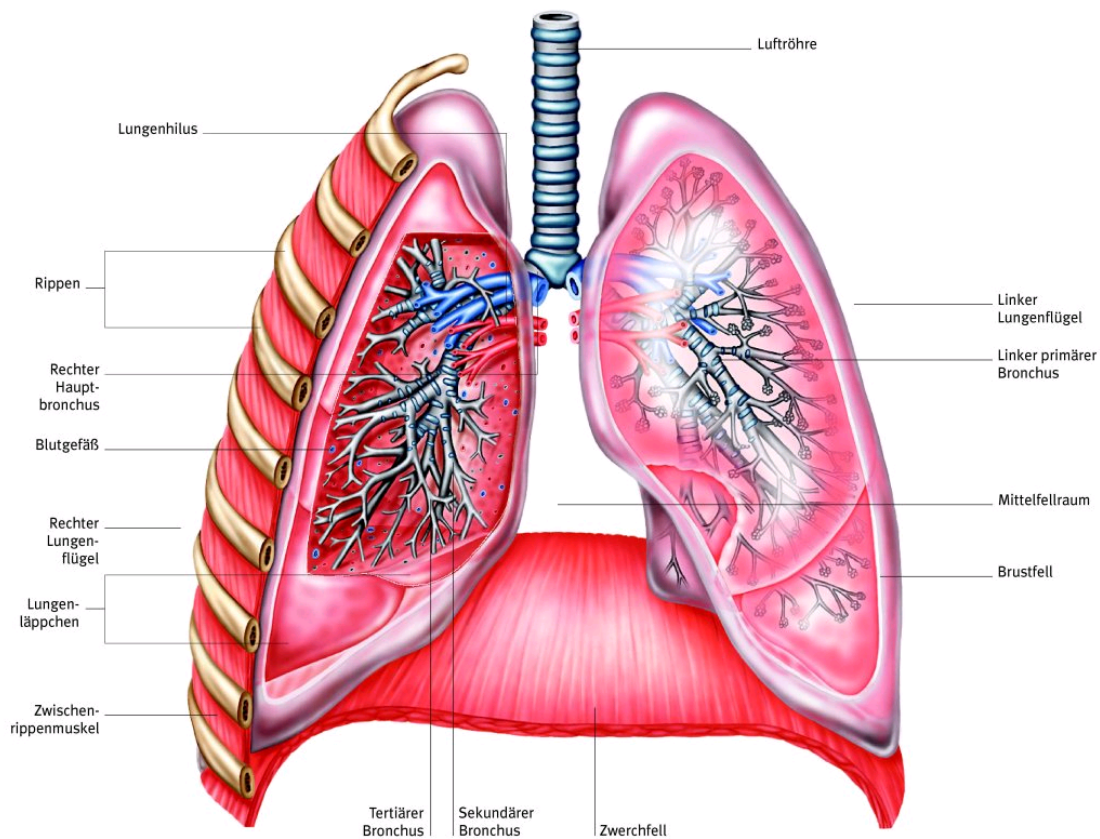


Abb. 1: Darstellung der humanen Lunge [2]

Die Alveolen haben einen Durchmesser von ca. 0,2-0,3 mm. Hier findet die Oxygenierung des Blutes statt. Die Anzahl dieser sackartigen Erweiterungen wird auf ca. 300 Millionen und ihre Gesamtoberfläche auf 100 m² geschätzt [3]. Die Alveolen sind von einem dichten Kapillarnetz umgeben, durch das venöses Blut der Arteria pulmonalis fließt. Benachbarte Alveolen sind durch das Septum interalveolare voneinander getrennt. In den Septen befinden sich einzelne Poren (Kohnsche Poren), die die Alveolen miteinander verbinden [4]. Das Epithel der Alveolen weist 2 Zelltypen auf. Man unterscheidet Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ I und Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ II. Erstere werden aufgrund ihrer flachen (50-150 nm) Struktur und ihrer kontinuierlichen Lage auch als Deckzellen bezeichnet. Auf der Oberfläche lassen sich zahlreiche Einsenkungen erkennen, die auf Mikropinozytose hinweisen. Die Alveolarepithelzellen Typ II sind größer und liegen häufig einzeln. Die auch als große Alveolarzellen oder Nischenzellen (kleine Gruppenbildung in den Ecken der Alveolen) bezeichneten Pneumozyten besitzen als sezernierende Zellen zahlreiche Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, einen gut entwickelten Golgi-Apparat und Sekretgranula. Sie produzieren ein Sekret, welches sich als Flüssigkeitsfilm über der gesamten Oberfläche der Alveole als monomolekularer Protein-Phospholipidfilm – Surfactant – ausbreitet [5]. Durch das Surfactant wird die Oberflächenspannung der Alveolen herabgesetzt.

Das Bindegewebe der Septa interalveolare besteht aus kollagenen und retikulären Bindegewebsfasern und einem dichten elastischen Fasernetz. Neben den Kapillarverzweigungen finden sich dort auch noch Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und Leukozyten [5].

Der Austausch der Atemgase findet an der alveolokapillären Membran in den Alveolen statt, die mit ihrer großen Oberfläche (100 m²) und mit einem Diffusionsweg von nur 1 µm die idealen Voraussetzungen für einen effektiven Austausch bieten [6].

2.2 Vergleich der humanen und murinen Lunge

In der vorliegenden Arbeit wurden für die präklinischen toxikologischen Inhalationsuntersuchungen murine Prüfsysteme verwendet. Deshalb wird in diesem Abschnitt kurz auf die wichtigsten Unterschiede zwischen der humanen und murinen Lunge eingegangen.

Die murine Lunge unterscheidet sich von der humanen Lunge nicht nur in der Anatomie sondern auch in der Physiologie. Die Größe der Lunge und die der alveolaren Oberfläche variieren um mehr als den Faktor 1000. Ein weiterer Unterschied betrifft die Dimension der Atemwege. So ist der Durchmesser des Hauptbronchus einer humanen Lunge 10-15 mm groß und der einer Maus ca. 1 mm [7]. Neben der Größe der Atemwege differieren diese

auch in ihrer Anzahl. In Tabelle 1 ist eine Reihe von Unterschieden zwischen humanen und murinen Lungen aufgelistet.

Ein bedeutender physiologischer Unterschied betrifft die Metabolisierungsrate. Kleintiere haben im Vergleich zu Menschen eine viel größere Metabolisierungsrate. Dadurch ist im Verhältnis zum Körpergewicht der Luftdurchsatz in der Lunge erhöht. Das Verhältnis des Atemminutenvolumens zu Körpergewicht in Mäusen beträgt ca. 1,7 ml/min/g, während dieses Verhältnis in Menschen in 0,08 ml/min/g resultiert [8, 9]. Die Konsequenz ist, dass Mäuse größere relative Volumina eines verabreichten Aerosols inhalieren werden.

Tabelle 1: anatomische und physiologische Unterschiede zwischen humaner und muriner Lunge

	Mensch	Maus
Körpergewicht [g]	74.000	23
Lungenvolumen [ml]	4340	0,74
Alveolarfläche [cm ²]	1.430.000	680
Atemzugvolumen [ml]	500	0,2
Atemfrequenz [min ⁻¹]	12	220
Atemminutenvolumen [ml/min]	6000	40
Atemwegswiderstand [cmH ₂ O/ml ⁻¹ * s ⁻¹]	0,0016	1

Neben den erwähnten Unterschieden gibt es auch Gemeinsamkeiten zwischen humanen und murinen Lungen. Beide bestehen aus 5 Lappen und in beiden finden sich glatte Muskeln in der Trachea bis hin zu den terminalen Bronchiolen [10]. Weiterhin existieren tracheale mukosale Schleimdrüsen in beiden Spezies.

Murine Prüfsysteme bieten viele Vorteile. Nicht ohne Grund werden Mäuse in der Lungenforschung als häufigste Art eingesetzt [11]. Unter anderem besitzen sie ein sehr gut charakterisiertes Immunsystem, es gibt ein enormes Methoden- und Reagentienspektrum um Vorgänge in dieser Spezies zu charakterisieren und sie haben einen kurzen Reproduktionszyklus und ein sehr gut entschlüsseltes Genom [12]. Weiterhin bieten sie den Zugang zur transgenen Technologie, um Krankheiten besser erforschen zu können.

2.3 Die Lunge als Eintrittspforte für lokale und systemische Arzneitherapien

Als Applikationsart bezeichnet man die Art und Weise, wie ein Medikament verabreicht wird. Die Wahl des passenden Applikationsweges muss sowohl nach pharmakologischen als auch nach organisatorischen und ökonomischen Gesichtspunkten getroffen werden.

Doch was spricht für eine pulmonale Arzneimittelgabe?

Die große innere Oberfläche der Lunge und das dünne Alveolarepithel begünstigen zum einen eine schnelle Arzneimittelabsorption [13]. Desweiteren befindet sich das kapillare Netzwerk, durch das das gesamte Herzminutenvolumen fließt, nur einige Mikrometer benachbart zur absorbierenden Oberfläche [14]. Kleine Moleküle, darunter besonders die

lipophilen, werden daher bereits innerhalb von Sekunden nach Inhalation absorbiert. Generiert man aus einem Vehikel ein Aerosol mit einem massenbezogenen medianen aerodynamischen Durchmesser (MMAD) von weniger als 5 μm , so können die Alveolen gezielt zur Arzneimittelabsorption angesteuert werden [13].

Lokale entzündliche Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD sind zurzeit die Hauptindikationen für eine Inhalationstherapie. Die topische Arzneistoffgabe minimiert dabei potentielle Nebenwirkungen, wie sie bei hohen systemischen Konzentrationen auftreten würden [15]. Doch auch der Nutzen einer pulmonalen Arzneistoffgabe zur systemischen Therapie von Erkrankungen rückt immer mehr in den Vordergrund aktueller Forschungen. So könnten Lipidnanopartikel über diese Route immunmodulierende Arzneimittel direkt in die lokalen Lymphknoten transportieren [16]. Besonders vielversprechend scheint dieser Weg auch für Arzneistoffkandidaten zu sein, die einem hohen First-Pass-Metabolismus oder einem gastrointestinalen Abbau durch Denaturierung unterliegen, wie z.B. Proteine und Peptide. So fanden Shen *et al.* heraus, dass die proteolytische Enzymaktivität in der Lunge geringer ist als im Gastrointestinaltrakt [17]. Zwar werden metabolische Enzyme auch in der Lunge gefunden, doch zeigen Studien, dass sich nach pulmonaler Gabe eine verbesserte Bioverfügbarkeit von Peptiden und Proteinen nachweisen lässt [18, 19]. Insgesamt weist die Lunge im Vergleich zu Leber und Darm eine geringere Metabolisierungsrate und eine geringere Aktivität an Efflux-Transportern auf [20, 21]. Der Nutzen einer systemischen Inhalationstherapie mit kleinen Arzneistoffmolekülen, wie zum Beispiel Fentanyl oder Morphin, liegt vor allem in der schnellen Absorptionsrate von wenigen Sekunden. Eine Vielzahl von Krankheitssymptomen könnte von einer schnellen Medikation profitieren [22-24]. Die Arzneimittelgabe über die Lunge, sei es zum Zwecke der lokalen oder der systemischen Therapie, bietet dem Patienten somit viele Vorteile. Schließlich sei erwähnt, dass die pulmonale Gabe eine Alternative zu invasiven Therapieformen sein könnte, was zu einer erhöhten Patientencompliance beitragen würde.

2.4 Pulmonaler Applikationsweg zur lokalen Behandlung von Atemwegserkrankungen

Patienten, die an Asthma oder COPD leiden, profitieren erheblich von einer Inhalationstherapie. Die lokale Therapie dieser entzündlichen Atemwegserkrankungen minimiert mögliche Nebenwirkungen aufgrund gezielter Arzneimitteldeposition und reduzierter systemischer Aufnahme.

2.4.1 Asthmatherapie

Asthma ist ein komplexes Syndrom mit vielen klinischen Phänotypen. Mit geschätzten 300 Millionen betroffenen Menschen zählt es zu einer der häufigsten chronischen Erkrankungen [25]. Im Jahr 2005 starben ca. 255.000 Menschen weltweit an den Folgen asthmatischer Erkrankungen [26]. Allein 10-12% der Erwachsenen sowie 15 % der Kinder sind betroffen [27]. Allergisches Asthma ist die am weitesten verbreitete allergische Erkrankung bei Kindern [25].

Zurzeit ist eine Heilung des allergischen Asthmas nicht möglich. Die breite Verwendung inhalativer Kortikosteroide (ICS) bei Patienten mit persistierendem Asthma führte in den vergangenen Jahren jedoch mit überzeugender Evidenz zu einem Rückgang der Mortalität [28].

Bei der symptomatischen Therapie des Asthma bronchiale stehen vor allem zwei Substanzgruppen zur Verfügung. Als Bedarfsmedikation werden Bronchodilatoren eingesetzt, die sogenannten „Reliever“. Sie vermindern die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur und führen so zu einer schnellen Symptomlinderung. Langzeitmedikamente inhibieren den zugrunde liegenden inflammatorischen Prozess. Sie werden auch als „Controller“ bezeichnet und sind zur Dauertherapie geeignet.

Zu den Bronchodilatoren, die vor allem inhalativ angewendet werden können, gehören die β_2 -Sympathomimetika sowie Anticholinergika. Die inhalative Gabe von β_2 -Sympathomimetika führt zur Relaxation glatter Muskelzellen, Induktion der Mukussekretion und zu einer Verringerung des Gefäßwiderstandes.

Gegenüber den kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetika als Mittel der Wahl zur bedarfsorientierten Behandlung einer akuten Bronchialobstruktion, werden langwirksame β_2 -Sympathomimetika zur Prophylaxe von Asthmaanfällen bei mittelschwerem und schwerem Asthma eingesetzt. Im Gegensatz zu den Kortikosteroiden haben sie keinen wesentlichen Einfluss auf inflammatorische Zellen des Atemtraktes und die Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität und sollten daher immer zusammen mit inhalativen Glukokortikoiden eingesetzt werden. Eine systemische Dauertherapie mit langwirksamen

β_2 -Sympathomimetika ist nur dann indiziert, wenn die Asthmasymptomatik inhalativ nicht ausreichend verbessert werden kann.

Anticholinergika wirken deutlich schwächer bronchodilatorisch als die β_2 -Sympathomimetika. Oral gegeben führen tertiäre Verbindungen außerdem zur erschwerten Expektoratation infolge einer Hemmung der Bronchialsekretion. In der Asthmatherapie kommt daher zurzeit nur die quartäre Verbindung Ipratropiumbromid zur Anwendung. Sie wird inhalativ angewendet, wird nicht resorbiert und wirkt daher nur lokal.

Zu den antientzündlich wirkenden Pharmaka, die inhalativ eingesetzt werden, gehören die Mastzellstabilisatoren und Glukokortikoide.

Die Mastzellstabilisatoren Cromoglicinsäure (DNCG) und Nedocromil hemmen die Freisetzung anaphylaktischer Mediatoren. Im Erwachsenenalter sind sie meist wirkungslos und auch in der Asthma-Therapie von Kindern haben sie ihren Stellenwert gegenüber der effektiveren, aber ebenso nebenwirkungsarmen niedrig dosierten ICS verloren.

Die Therapie mit ICS ist die effizienteste antientzündlich wirkende Medikation bei Asthma bronchiale [29]. Eingesetzt werden die inhalativen Glukokortikoide als Erstlinientherapie bei Patienten mit persistierendem Asthma. Bei nicht ausreichender Asthmakontrolle in niedrigen bis moderaten Dosen wird die additive Therapie mit einem lang wirksamen Betamimetikum mittels einer Fixkombination empfohlen. Die „Add-on-Therapie“ zeigte eine stärkere Verbesserung der Beschwerden als die Erhöhung der ICS-Dosis [30]. Während bei der inhalativen Therapie mit Glukokortikoiden systemische Nebenwirkungen aufgrund der relativ niedrigen Dosen und dem hohen First-Pass-Effekt der eingesetzten Stoffe weitgehend fehlen, stellen sie bei der systemischen Applikation eine Gefahr da. Die „Patientenleitlinie zur Nationalen Versorgungsleitlinie Asthma“ nennt hier vor allem Gewichtszunahme, Anstieg des Blutzuckers, Knochenentkalkung sowie eine Verdünnung der Haut. Deswegen und da sich besonders bei schwerem Asthma die Entzündung auch in den kleinen Atemwegen zeigt, besteht ein großes Interesse an neuen Therapieansätzen und Arzneistoffträgersystemen (*Drug-Delivery-Systeme*), die einen besseren peripheren Transport von Stoffen ermöglichen.

Eine Neuentwicklung in der Arzneitherapie des Asthma bronchiale ist die kausale Therapie mit dem monoklonalen Anti-IgE-Antikörper Omalizumab. Er richtet sich gegen ein Epitop im Fc-Anteil von IgE. Durch Komplexbildung mit den frei zirkulierenden IgE-Molekülen wird deren Bindung an den IgE-Rezeptor auf den Mastzellen und Basophilen Granulozyten verhindert [31]. Obwohl Omalizumab ein neuer innovativer Ansatz in der Asthmatherapie zu sein scheint, ist die Anwendung aufgrund der zurzeit nur möglichen Applikationsform als s.c. Injektion alle zwei bis vier Wochen wenig verbreitet. Hier würde die Asthmatherapie von der Entwicklung eines geeigneten Arzneistoffträgersystems zur inhalativen Gabe von Omalizumab erheblich profitieren.

2.4.2 Therapie der COPD

Die COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) ist definiert als eine progredient verlaufende, nicht vollständig reversible Einschränkung des Atemflusses, die sowohl ein Emphysem als auch eine chronische Bronchitis oder eine Erkrankung der kleinen Luftwege umfasst. Sie geht immer mit einer Atemwegsobstruktion einher [32]. Nach Statistiken der WHO ist die COPD die fünfthäufigste Todesursache und nach Schätzungen der Goldinitiative wird sie bis 2020 auf den 3. Platz vorgerückt sein [33]. Obwohl die COPD bis heute nicht heilbar ist, hat sich durch die frühzeitige Diagnosestellung und viele kleine therapeutische Optionen die Prognose im Vergleich zu früher verbessert [34].

Als Basismedikamente zur Linderung der Beschwerden bei COPD werden auch hier inhalativ Bronchodilatoren wie Anticholinergika und β_2 -Sympathomimetika eingesetzt.

In neueren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass anders als beim Asthma Anticholinergika (Muscarinrezeptor-Antagonisten) besser bronchodilatatorisch wirken als kurz wirksame β_2 -Sympathomimetika. Dies steht in Übereinstimmung mit der zentralen Rolle von Acetylcholin bei der Pathophysiologie der COPD und hat zur Entwicklung von Tiotropiumbromid geführt, das nur einmal täglich inhalativ appliziert werden muss [35]. Der Einsatz von inhalativen Glukokortikoiden ab Schweregrad II der COPD wird kontrovers diskutiert [36, 37]. Nach neusten Erkenntnissen reagieren nur ca. 10-15 % der COPD Patienten mit einer spürbaren Verbesserung der Lungenfunktion auf eine Glukokortikoidbehandlung [32].

Der zu inhalierende Arzneistoff VR496 befindet sich zurzeit in der Entwicklung. Er vermindert die Mukusproduktion und könnte so eine mögliche Therapieoption für COPD Patienten und Patienten mit zystischer Fibrose bieten [38].

2.4.3 Inhalative Antiinfektiva

Das erste inhalative Protein kam 1993 auf den Markt. Dornase alfa wird zur Reduzierung von Atemwegsinfektionen eingesetzt und trägt zur Verbesserung der Lungenfunktion bei [39, 40]. Ein weiteres inhalativ angewandtes Antiinfektivum ist Tobramycin [41, 42]. Es wird als vernebelte Lösung bei Patienten mit zystischer Fibrose angewandt. Zurzeit wird an einer Trockenpulverformulierung gearbeitet, die eine höhere Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs verspricht. Die inhalative Gabe von Gentamicin ist in der Behandlung der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* bei zystischer Fibrose indiziert [43]. Weitere inhalativ angewendeten Antiinfektiva sind das antiviral wirkende Zanamivir und Pentamidine zur Behandlung von *Pneumocystis carinii* Pneumonie [44, 45]. Vielversprechend ist die Entwicklung von ABIP (*Amphotericin B inhalation powder*). Eine pulmonale Gabe direkt an den Ort der Infektion könnte systemische, dosislimitierende Nebenwirkungen verhindern, die bei intravenöser Gabe von Amphotericin B Formulierungen auftreten [46].

2.4.4 Inhalative Arzneitherapie bei Lungenkrebs

Weitere erfolgversprechende Therapieansätze finden sich im Bereich der Chemotherapie von Lungenkrebs. Durch die pulmonale Arzneistoffapplikation erhöht sich die zytotoxische Dosis, die den Tumor erreicht, während die systemische Toxizität minimiert wird. Doxorubicin-HCl Inhalationslösung befindet sich gegenwärtig in der klinischen Phase I [47]. Die inhalative Gabe von Doxorubicin führt im Vergleich zur intravenösen Gabe zu einer höheren Arzneimittelexposition am Zielort. Auch die inhalative Gabe von Interleukin-2 zur Bekämpfung von Lungenmetastasen wird bereits klinisch getestet. Diaz *et al.* konnten durch diese Applikation eine Immunmodulation in Patienten mit Lungenmetastasen nachweisen [48]. Das Team um Koshkina wies bei Mäusen mit Lungentumor eine signifikante Besserung des Krankheitsverlaufs und eine verlängerte Überlebensrate durch Verabreichung eines Paclitaxelaerosols nach [49]. Die inhalative Gabe von Difluormethylornithin und 5-Fluorouracil führte zu einer 50 bzw. 60 prozentigen Abnahme von Lungentumoren bei Mäusen [50].

2.4.5 Vakzinierung

Ein derzeitiger Forschungsschwerpunkt liegt in der Entwicklung von Vakzinierungsstrategien über die Lunge. Nicht nur aufgrund der verbesserten Compliance vor allem bei Kindern sondern auch wegen einer stärkeren lokalen Immunantwort im Vergleich zur intramuskulären Injektion stellt die inhalative Gabe eine sehr gute innovative Alternative dar. So ergab zum Beispiel die inhalative Gabe von Masernvakzinen eine erhöhte Immunogenität bei geringerer Dosis im Vergleich zur injizierten Form [51, 52]. Eine Bekämpfung der Tuberkulose erhofft man sich durch die Möglichkeit einer Impfung durch inhalative Gabe eines Vakzins. Bivas-Benita *et al.* beobachteten eine starke Immunantwort nach pulmonaler Verabreichung abgeschwächter Antigene vom *Mycobacterium tuberculosis*, welche in Nanopartikel verpackt waren [53].

2.5 Pulmonaler Applikationsweg zur systemischen Behandlung von Erkrankungen

Gegenwärtig befindet sich kein zu inhalierender Arzneistoff für eine systemische Therapie auf dem Markt. Doch die physiologischen Gegebenheiten der Lunge lassen die Inhalation für eine systemische Arzneitherapie sehr aussichtsreich erscheinen.

Die schnelle Absorption von kleinen Molekülen könnte z. B. zur Behandlung von Symptomen wie Schmerzen, Panikattacken, Angstzuständen, Übelkeit sowie Bronchokonstriktion genutzt werden [23, 24, 54]. Im Folgenden soll nur kurz auf einige innovative systemische inhalierbare Therapiemöglichkeiten eingegangen werden.

2.5.1 Schmerztherapie

Neben transdermalen therapeutischen Systemen und sublingualen schnell auflösenden Tabletten gibt es eine weitere Alternative zur oralen Applikation in der Schmerztherapie, die inhalierbare Schmerzmedikation. Zurzeit befindet sich das von der Firma YM BioSciences entwickelte inhalierbare Produkt AeroLEF, welches freies und liposomal verkapseltes Fentanyl enthält, in der klinischen Phase II. Als Indikationsgebiete sind Schmerzbehandlungen in der Krebstherapie sowie nach chirurgischen Eingriffen vorgesehen. Die Firma Aradigm entwickelte ein elektronisches Inhalationssystem (AERx), mit dem Morphin und Fentanyl intrapulmonal verabreicht werden können. Das System ist dahingehend konzipiert, Durchbruchschmerzen sowie postoperative Schmerzen zu kupieren. Ein weiterer Pharmakonzern (Solvay Pharmaceuticals), der sich u.a. mit der inhalativen Schmerztherapie beschäftigt, entwickelte zusammen mit Nektar Therapeutics ein pulmonal zu verabreichendes Dronabinolprodukt. Dieses Produkt befindet sich zurzeit ebenfalls in Phase II der klinischen Testung. In einer ersten Studie konnte gezeigt werden, dass bereits nach 3 Minuten effektive Plasmaspiegel von Dronabinol gemessen werden konnten, während die orale Kapselgabe von Dronabinol erst nach 2 Stunden effektive Plasmaspiegelskonzentrationen aufwies [55].

2.5.2 Osteoporose

Die zurzeit wirkungsvollste Therapie der Osteoporose erfolgt mit dem Wirkstoff Teriparatid (Forteo, Lilly) [56]. Nachteilig an dieser neuen Therapieform ist, dass der Wirkstoff injiziert werden muss, da er ansonsten im Magen zerstört werden würde. Um den Patienten die unattraktiven täglichen Injektionen zu ersparen, arbeitet Lilly zusammen mit der Firma Alkermes an einer inhalierbaren Version von Forteo.

2.5.3 Sexuelle Dysfunktion

Auch die Behandlung der erektilen Dysfunktion, der vorzeitigen Ejakulation und der weiblichen sexuellen Dysfunktion würde von einer schnellen Inhalationstherapie profitieren.

Die Firma Aradigm testet derzeit die inhalative Gabe von Testosteron über ihr AERx System zur Behandlung der weiblichen sexuellen Dysfunktion. Bei postmenopausalen Frauen wurde bereits nach ein bis zwei Minuten ein therapeutischer Plasmaspiegel erreicht [57]. Weitere drei pulmonale Arzneistoffformulierungen befinden sich gerade in der Entwicklung von Vectura. Dabei handelt es sich um inhalierbares pulverförmiges Apomorphin zur Behandlung der erektilen Dysfunktion und der weiblichen sexuellen Dysfunktion sowie Clomipramin zur inhalativen Therapie der vorzeitigen Ejakulation.

2.5.4 Diabetes – inhalierbares Insulin

Nach der Weltgesundheitsorganisation litten im Jahr 2000 ca. 171 Millionen Menschen weltweit an Diabetes [58]. Bis zum Jahr 2030 soll die Zahl der Patienten auf ca. 366 Millionen ansteigen. Studien zeigen, dass Patienten mit Diabetes von einer frühzeitigen Insulintherapie profitieren würden [59]. Um die Compliance zu steigern und damit die Angst vor einer frühzeitigen Insulintherapie zu mindern, wurden bereits alternative Applikationswege gesucht. Doch weder der Weg über transdermale Systeme noch die nasale Applikation führten zu einer ausreichenden Bioverfügbarkeit und Reproduzierbarkeit [60]. Vielversprechend schien im Gengenzug jedoch die inhalierbare Gabe zu sein. Cefalu *et al.* konnten bereits 2001 nachweisen, dass Typ 2 Diabetiker, die Insulin inhalierten, eher ihren Blutzucker kontrollieren konnten als Patienten, die Insulin injizierten. Gerber *et al.* sprachen von einer erhöhten Akzeptanz der Insulintherapie und einer verbesserten Lebensqualität bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern [61-63]. 2006 kam das erste inhalierbare Insulin (Exubera) auf den Markt, welches jedoch bereits nach nur einem Jahr vom amerikanischen Arzneimittelhersteller Pfizer wieder vom Markt genommen wurde. Pfizer gab die Lizenz an Nektar Therapeutics zurück, die das Medikament seinerzeit entwickelt hatten. Die fehlende Akzeptanz der Patienten lag vor allem daran, dass der Inhaler zu groß und zu schwer im Handling war [64]. Die Dauer der Einnahme höherer Dosen konnte sich bis hin zu mehreren Minuten hinziehen, da die Höhe der Dosis nicht frei gewählt werden konnte [64]. Der gewünschte Nutzen einer diskreten Arzneitherapie war damit nicht gegeben. Die Nachteile überwogen gegenüber den Vorteilen einer einfacheren Lagerung und schmerzfreien Applikation. Ein weiteres Problem stellten die Kosten der Anwendung dar. Insgesamt musste man mit fünffach höheren Therapiekosten rechnen. Neben den beträchtlichen Entwicklungskosten war einer der Kostentreiber die geringe Bioverfügbarkeit von 10 – 20 % des inhalierten Insulins [65]. Die kritische Beurteilung der mit Exubera

durchgeführten Studien war schließlich einer der Hauptgründe, warum das unabhängige Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) eine negative Bewertung über den Nutzen dieser neuen Therapie abgab und somit eine Kostenerstattung nicht ermöglichte. Eine Verbesserung hinsichtlich der Diabetestherapie wurde auch von den Ärzten nicht erkannt. Die Dosierung schien nicht immer verlässlich, so dass bereits Passivrauchen die resorbierte Menge herabsetzen konnte [66]. Außerdem ergaben sich Bedenken hinsichtlich der Lungenverträglichkeit und dem Zusammenhang zwischen der inhalativen Gabe von Insulin und dem Auftreten von mit Diabetes assoziierten Spätkomplikationen. Nach Bekanntwerden von sechs Lungenerkrankungen bei Exubera-Anwendern gab auch Nektar 2008 alle Bestrebungen auf, einen neuen Partner für die Vermarktung zu finden. In einer aktuellen Warnung der FDA über eine gesteigerte Inzidenz an Lungenkrebs wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Zahl der Erkrankungen zu gering sei um eine Kausalität zu belegen. Nur noch die MannKind Corporation aus Valencia forscht weiterhin an einem inhalierbaren Insulin namens Afrezza [67, 68]. Die US-Gesundheitsbehörde hat dem von Mannkind entwickelten inhalierbaren Insulin Afrezza jedoch kürzlich (16.03.2010) vorerst die Zulassung verweigert. Das Unternehmen soll neue klinische Daten vorlegen. Ob Afrezza auf den Markt kommt, ist ungewiss.

2.6 Pulmonale Arzneistoffträgersysteme

Um die Vorteile der pulmonalen Arzneistofftherapie nutzen zu können, sind in den letzten Jahren neue Arzneistoffträgersysteme entwickelt worden. Partikuläre Transportsysteme wie Liposomen, polymere Mikro- oder Nanopartikel und Lipidnanopartikel sollen dazu beitragen, die therapeutische Breite von neuen sowie von etablierten Wirkstoffen zu verbessern, z.B. durch verbesserte Adhäsionseigenschaften am Lungenepithel [69]. Im folgenden Abschnitt werden pulmonale Arzneistoffträgersysteme näher erläutert, die bereits in der Therapie zum Einsatz kommen bzw. als vielversprechend erscheinen.

2.6.1 Liposomen

Liposomen stellen eines der meistuntersuchten Systeme für die kontrollierte Freisetzung von Pharmaka in die Lunge dar [70]. Sie scheinen für einen Wirkstofftransport zur Lunge besonders geeignet zu sein, da diese Arzneistoffträgersysteme dem endogenen Lungensurfactant ähneln [71]. Liposomen bestehen aus einer oder mehreren Phospholipiddoppelschichten. Sie können in Abhängigkeit von ihrer Größe und der Anzahl an Phospholipiddoppelschichten wie folgt gegliedert werden: große multilamellare Vesikel (MLV), kleine multilamellare Vesikel (SMLV), kleine unilamellare Vesikel (SUV) und große unilamellare Vesikel (LUV). Liposomen können in einem breiten Größenbereich hergestellt werden. Aufgrund ihrer doppelschichtigen Struktur können lipophile Arzneistoffe in den Bilayeranteilen und hydrophile Arzneistoffe im inneren Wasserkern inkorporiert werden [72]. Um den Transport der Pharmaka zu verbessern, wurde bereits eine Vielfalt von Wirkstoffen verschiedenster Wirkstoffklassen inkorporiert und inhalativ als liposomales Aerosol verabreicht: z. B. Immunsuppressiva wie Cyclosporin A [73, 74], Glukokortikoide wie Dexamethason [75, 76], Antibiotika wie Gentamicin [77, 78], Analgetika wie Fentanyl [54], Zytostatika wie Paclitaxel [79, 80] und Proteine wie IL-2 [81] oder Insulin [82]. Die Verkapselung des Wirkstoffs in Liposomen bietet viele Vorteile, wie eine verbesserte Arzneistoffaufnahme und eine erhöhte Wirkstofffreisetzung. Die wichtigste Eigenschaft liegt jedoch in der verminderten Arzneistofftoxizität. Nach Inkorporierung in Liposomen ist die systemische Toxizität einiger Wirkstoffe merklich reduziert, ohne dass diese dabei an Wirksamkeit verlieren [83]. Darüber hinaus kann durch die Auswahl der Lipidzusammensetzung der Liposomen eine kontrollierte Freigabe des Wirkstoffs und eine pulmonale Retention erreicht werden [84, 85].

Nachteilig an der Arzneiform Liposom ist, dass bei der Herstellung oft nicht auf organische Lösungsmittel verzichtet werden kann und Liposomen oft Undichtigkeiten aufweisen wodurch

der Arzneistoff schon vorzeitig austreten kann. Ein weiterer Makel dieses Arzneistoffträgers ist, dass er instabil in biologischen Flüssigkeiten ist [86].

2.6.2 Polymere Mikro- und Nanopartikel

Polymere Mikropartikel (auch Mikrosphären genannt) und Nanopartikel (auch Nanosphären genannt) sind aus bioabbaubaren Polymeren zusammengesetzt, die natürlicher oder synthetischer Herkunft sind. Mikropartikel können in einem breiten Größenbereich von 1 bis 999 μm hergestellt werden. Eine Vielzahl von hydrophilen und lipophilen Molekülen kann in diese Vektoren verkapselt oder inkorporiert werden. Im Vergleich zu Liposomen sind Mikropartikel physikochemisch betrachtet stabiler und erlauben dadurch eine langsamere Freisetzung und eine verlängerte Wirksamkeit der verkapselten Substanz. Die pulmonale Verabreichung von aerosolisierten Mikropartikeln bietet einen verbesserten Schutz des Wirkstoffs vor vorzeitigem enzymatischem Abbau [87]. Mikropartikel können unter anderen aus folgenden Polymeren hergestellt werden: Albumin, Polylactidsäure (PLA), Polyglycolsäure (PGA), einem Kopolymer aus beiden (PLGA) und Polybutylcyanoacrylat (PBC). Durch Variation der Herstellungsbedingungen können die morphologischen Eigenschaften der Mikrosphären wie Größe, Form und Porosität beeinflusst werden. Des Weiteren sind sie weniger anfällig für das sogenannte hygroscopische Wachstum in den Atemwegen. Darunter versteht man eine Partikelgrößenzunahme durch Aufnahme von Wasserdampf aus den Atemwegen.

Polymere Nanopartikel besitzen vergleichbare Eigenschaften wie die Mikropartikel. Arzneistoffe können an die Oberfläche gebunden oder in das Innere der Partikel inkorporiert werden. Auch sie schützen den Wirkstoff vor vorzeitigem enzymatischen Abbau und können die Bioverfügbarkeit durch kontrollierte Arzneistofffreigabe modifizieren. Polymere Nanopartikel werden in einem Größenbereich von 1 bis 999 nm hergestellt [88].

Eine Fülle von Arzneistoffen der verschiedensten Wirkstoffklassen wurde sowohl in Mikro- als auch in Nanopartikel inkorporiert: Kortikosteroide wie z. B. Beclomethason [89] oder Betamethason [90], Antibiotika wie z. B. Rifampicin [91, 92] und Zytostatika wie z. B. Camptothecin [93] oder Doxorubicin [94].

Nach über 30 Jahren Forschung sind jedoch nur wenige polymere Arzneistofftransportsysteme, die auf polymeren Mikropartikeln basieren, auf dem Markt. Dazu gehören z.B. Enanton Depot (Wirkstoff: Leuprorelin) und Parlodel LA (Wirkstoff: Bromocriptin). Eine Reihe von Nachteilen wie z. B. vorhandene Zytotoxizität und schwierige Herstellungsbedingungen erschweren weitere Markteinführungen. So ist bis heute die Möglichkeit der Herstellung im Großmaßstab nicht gegeben [95].

2.6.3 Wässrige und nichtwässrige Lösungen und Suspensionen

Wässrige Beclomethasondipropionat-Suspensionen wurden u. a. bei dem akuten Atemnotsyndrom bei Neugeborenen eingesetzt. Die kolloidalen Suspensionen waren mit einem synthetischen pulmonalen Surfactant (Tyloxapol) stabilisiert. Diese konzentrierte Nanocrystal®-Dispersion von Beclomethasondipropionat wurde in einer Studie mittels eines Ultraschallverneblers aerosolisiert und mit dem handelsüblichen, treibgasbetriebenen Fertigarzneimittel Vanceril® verglichen. Dabei zeigten erste Studienergebnisse, dass im Vergleich zu dem Fertigarzneimittel mit der arzneistoffhaltigen wässrigen Suspension besser inhalierbare Fraktionen generiert werden konnten, was zu einer vorteilhafteren Lungengängigkeit führt.

Weitere Möglichkeiten für eine inhalative Applikation bieten wässrige Arzneistofflösungen. Untersuchungen mit Insulin, Morphinhydrochlorid, Cidofovir und PlasmidDNA ergaben, dass eine pulmonale Applikation dieser Wirkstoffe sehr vielversprechend ist [96]. So zeigte Cidofovir bei inhalativer Gabe eine höhere Wirksamkeit und bessere antivirale Wirkung als bei subkutaner Applikation [97]. Auch bei pulmonaler Gabe einer wässrigen Insulinlösung mittels des AERx®-Applikationssystems konnte im Vergleich zur subkutanen Applikation eine schnellere Absorption mit der Folge eines schnelleren Erreichens eines hypoglykämischen Effektes festgestellt werden [98].

Der Vollständigkeit halber sollen an dieser Stelle noch die nichtwässrigen Lösungen und Suspensionen erwähnt werden, wobei Arzneistoffe wie z. B. Gentamycin in flüssigem Halothan oder flüssigem Perfluorkarbon gelöst bzw. suspendiert werden [99-101].

2.6.4 Mizellare Lösungen und Mikroemulsionen

Ein weiteres Arzneistoffträgersystem, welches in die Lunge gebracht werden kann, stellen mizellare Lösungen dar. So konnte in *In-vivo*-Studien gezeigt werden, dass nach pulmonaler Applikation von mizellaren Arzneistofflösungen im Vergleich zu den nichtmizellaren Arzneistofflösungen eine höhere Bioverfügbarkeit vorlag und eine schnellere Absorption erfolgte. Zu den Arzneistoffen, die bereits mizellar verkapselt und getestet wurden, zählen z. B. Cyclosporin A und Paclitaxel [102, 103]. Emulgatoren, die bereits auf ihre *In-vivo*-Verträglichkeit untersucht wurden, sind z.B. Cremophor® EL (Glycerin-Polyethylenglykol-Ricinoleat) und die verschiedenen Poloxamere/Block-Copolymere wie z.B. Poloxamer 188.

Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der inhalativen Applikation von Mikroemulsionen als Arzneistoffträgersystem [104, 105]. Mikroemulsionen sind klare, stabile, isotrope Mischungen aus Öl, Wasser und Tensiden. Da sich aber nur wenige Arbeitsgruppen mit dieser Thematik beschäftigen, gibt es bisher nur *In-vivo*-Daten mit zwei inkorporierten Arzneistoffen, Cyclosporin A und Quercetin.

Nachteilig an mizellaren Lösungen ist, dass bei der Herstellung häufig organische Lösungsmittel zum Einsatz kommen und dass bei Verwendung von Polymeren zytotoxische Eigenschaften auftreten können.

2.6.5 Feste Lipidnanopartikel

Feste Lipidnanopartikel (*solid lipid nanoparticles*, SLN) werden aus Lipiden, Wasser und Emulgator(en) hergestellt. Seit Anfang der 90er Jahre wird an SLN als Alternative zu Polymernanopartikeln als Arzneistoffträgersystem geforscht [106, 107]. Die Lipidmatrix dieser kolloidalen Partikel besteht aus natürlich abbaubaren und verträglichen Lipiden. Diese Lipidmatrix ist bei Körpertemperatur fest. SLN kommen meistens in einem Größenbereich von 50-500 nm zur Anwendung [108-110]. Sie kombinieren die Vorteile von anderen kolloidalen Arzneistoffträgersystemen wie den Liposomen, Emulsionen und Polymernanopartikeln, umgehen dabei aber die Nachteile, die mit diesen verknüpft sind [111]. Die verschiedenen Vorteile wie die partikuläre Eigenschaft der SLN, die Möglichkeit hydrophile und hydrophobe Wirkstoffe zu verkapseln und die Freisetzungsgeschwindigkeit des inkorporierten Wirkstoffes zu beeinflussen, die Fähigkeit, die Wirkstoffe vor chemischer, photochemischer und oxidativer Zersetzung zu schützen, die Möglichkeit, den Wirkstoff in der Lipidmatrix zu immobilisieren, die einfache Übertragbarkeit der Herstellung vom Labormaßstab auf große Anlagen sowie die geringen Herstellungskosten geben den SLN im Vergleich zu den vorher genannten Arzneistoffträgern einen eindeutigen Attraktivitätsvorsprung [111].

Feste Lipidnanopartikel wurden bereits für dermale [112-114], perorale [115, 116], parenterale [117, 118], okuläre [119-121], rektale [122, 123] und pulmonale [16, 124, 125] Wirkstofftransporte genutzt.

Die Eigenschaften der SLN, das Freisetzungsprofil zu steuern, eine verlängerte Freisetzung zu erreichen und eine schnelle *In-vivo*-Biotransformation zu ermöglichen, bringen ihnen im Vergleich zu PLA- oder PLGA-Nanopartikeln Vorteile in Bezug auf die Wirkstofffreigabe in der Lunge. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SLN im Gegensatz zu Polymerpartikeln eine bessere Verträglichkeit in der Lunge besitzen [95, 126]. Das liegt daran, dass bei der Herstellung der SLN meistens physiologische Lipide verwendet werden. Des Weiteren ist es möglich, wässrige Nanosuspensionen oder getrocknete SLN-Pulverformulierungen zu verwenden, um für die pulmonale Applikation mittels Verneblern oder Pulverinhalatoren ein Aerosol zu erzeugen [95]. Es gibt bisher nur wenige publizierte Daten, die sich mit der pulmonalen Applikation von SLN als Arzneistofftransportsystemen beschäftigt haben. Pandey und Khuller untersuchten die chemotherapeutische Wirksamkeit von SLN, in die Isoniazid, Pyrazinamid oder Rifampicin inkorporiert war [127]. Ihre *In-vitro*- und *In-vivo*-Ergebnisse zeigten dabei eine langsame und verlängerte Freisetzung der Wirkstoffe aus den SLN. Liu et al. vernebelten SLN, in denen Insulin verkapselt war, und zeigten eine erfolgreiche Anwendung der SLN als pulmonales Trägersystem für Insulin [109]. Sie folgerten, dass auch andere Proteine für die systemische Anwendung transportiert werden könnten. Die Arbeitsgruppe um Rudolph berichtete, dass nach Aerosolapplikation von SLN, in die Genvektoren (HIV-1-TAT-Peptid) inkorporiert waren, eine signifikant erhöhte Genexpression gefunden werden konnte und ein DNA-Abbau ausblieb [128]. Beim Aerosolisieren dieser Genvektoren ohne SLN konnte kein Effekt gemessen werden, da die DNA abgebaut worden war. Depositions- und Clearance-Studien von inhalierten radioaktiv markierten SLN wurden von Videira *et al.* mittels Gamma-Szintigrafie durchgeführt [13, 16]. Sie beobachteten bereits nach wenigen Minuten eine Translokation der Nanopartikel in die Lymphbahn und nach 60 Minuten konnte eine signifikant erhöhte Aufnahme in den femoralen, mesenterialen, mediastinalen und axillären Lymphknoten gefunden werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhalation ein geeigneter Weg sein kann, um arzneistoffbeladene SLN in das lymphatische System zu bringen. Diese Zielstruktur ist ein wichtiger Angriffspunkt für Vakzinierungsstrategien oder in der Therapie von Lungenkrebs.

2.7 Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln

Auf dem Weg des Arzneistoffs zum Wirkort werden oft Arzneistoffträgersysteme zusammen mit dem Wirkstoff in körpereigene Zellen aufgenommen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass neben Mikro- auch Nanopartikel natürlicher und synthetischer Natur von verschiedenen Arten von Zellen aufgenommen werden können [129-131].

2.7.1 Endozytose (allgemein)

Als Endozytose wird im Allgemeinen die Aufnahme von Makromolekülen, partikulären Substanzen bis hin zu ganzen Zellen in Zellen bezeichnet. Diese Aufnahme von zellfremden Material in die Zelle wird durch das Einstülpen und Abschnüren von Teilen der Zellmembran unter Entstehung von intrazellulären Vesikeln gewährleistet. In Abhängigkeit von der aufzunehmenden Substanz und der Größe der gebildeten Vesikel unterteilt man die Endozytose in zwei verschiedene Aufnahmemechanismen [132].

Eine Möglichkeit der Aufnahme ist die Pinozytose, auch „Zelltrinken“ genannt. Pinozytose, zu der die meisten eukaryotischen Zellen befähigt sind, bezeichnet die Aufnahme von kleineren Flüssigkeitsmengen und darin gelösten Substanzen aus dem Umgebungsmedium einer Zelle in ihr Inneres. In Abbildung 2 sind verschiedene pinozytotische Aufnahmemechanismen dargestellt.

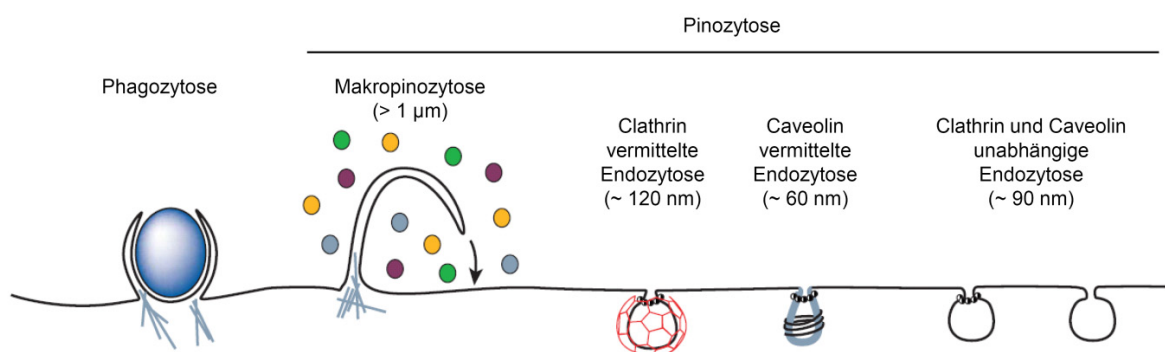


Abb. 2: Endozytotische Aufnahmewege (verändert nach [132])

Eine weitere Möglichkeit ist die Phagozytose, auch „Zellfressen“ genannt. Bei der Phagozytose werden größere Partikel wie Mikroorganismen von der Zelle umflossen und in große Vesikel (Phagosomen, $\varnothing \geq 250$ nm) aufgenommen. Diese Art der Aufnahme wird meist nur von spezialisierten phagozytierenden Zellen ausgeführt. Phagozyten haben eine

Vielzahl spezialisierter Oberflächenrezeptoren, deren Funktion an die Phagozytosemaschinerie der Zelle gekoppelt ist und die zu phagozytisches Material erkennen. Im Unterschied zur Pinozytose wird die Phagozytose durch eine Aktivierung von Rezeptoren ausgelöst. Die Rezeptoren übertragen ein Signal an die Zelle und starten die Zellantwort [133].

2.8 Toxizität von Nanopartikeln

Die gesundheitlichen Auswirkungen von Nanopartikeln/Nanotechnologie werden seit einiger Zeit in zunehmendem Maße in der Bevölkerung diskutiert. Eine verstärkte Berichterstattung elektronischer Medien sowie Printmedien hat zu einer Sensibilisierung der Bürger gegenüber dem Thema Nanopartikel (NP) geführt.

Um Licht ins Dunkel der möglichen Gefahren im Bereich der Nanotechnologie zu bringen und Risikostudien vergleichbar zu machen, hat das BMBF-Projekt „NanoCare - verantwortungsvoller Umgang mit der Nanotechnologie“ Standards für Toxizitätstests erarbeitet. An dem Projekt sind mehrere Universitäten, Forschungsinstitute und Unternehmen beteiligt. Weitere Forschungsprojekte, die sich mit den Risiken für Gesundheit und Umwelt durch Nanopartikel beschäftigen, sind:

- **NanoExpo** (Hierbei geht es um die Charakterisierung der Exposition gegenüber nanoskaligen Partikeln im Bereich des Arbeits- und Verbraucherschutzes)
- **LENA** (Lebensmittelsicherheit und Nanotechnologie)
- **Nanoderm** (Internationales Projekt zur Untersuchung der Haut als Barriere für Nanopartikel)
- **NANOTRANSPORT** (Ziel dieser Untersuchung ist das Verhalten von Aerosolen in der Umgebungsluft von Arbeitsplätzen in Betrieben, die Nanomaterialien herstellen, zu charakterisieren.)
- **CELLNANOTOX** (Die Intention dieses Projektes ist die Aufklärung der Wechselbeziehung zwischen den physikochemischen Eigenschaften von Nanopartikeln und ihrem möglichen toxischen Potential für verschiedene Organe des menschlichen Körpers.)

Nanopartikel existieren schon seit Jahrhunderten in unserer Atmosphäre und werden von verschiedenen Quellen freigesetzt. Natürliche Ursprünge sind beispielsweise Waldbrände, Vulkanausbrüche oder Sandstürme. Vom Menschen beeinflusste Prozesse wie zum Beispiel Kochen [134], Rauchen [135], Schweißarbeiten [136] und Autoabgase [137] sorgen zusätzlich für die Produktion von Nanopartikeln.

Neben Prozessen, bei denen Nanopartikel als Abfallprodukte anfallen, gibt es auch NP, die gezielt industriell produziert werden. Die Herstellung dieser NP beinhaltet einen Teilbereich eines neuen Industriezweiges – der Nanotechnologie.

Als Nanotechnologie werden verschiedene Technologiebereiche definiert. Diese Bereiche haben gemeinsam, dass sie Partikel eines Durchmessers von unter 100 nm in physikalisch und chemisch definierten Eigenschaften produzieren oder verarbeiten. Im Vergleich zu Mikropartikeln kommen neue oder erweiterte physikalische, biologische oder chemische Eigenschaften zum Vorschein. Dies kann durch folgende Sachverhalte erklärt werden: Nanopartikel haben eine sehr viel größere Partikeloberfläche pro Masseneinheit als Mikropartikel, welche unter bestimmten Voraussetzungen für eine hohe Reaktivität sorgt. Des Weiteren bestimmen, im Unterschied zu Mikropartikeln, nicht nur physikalische, sondern auch quantenphysikalische Gesetze die Stoffeigenschaften von Nanopartikeln.

Mit Hilfe der Nanotechnologie sollen völlig neue Entwicklungen sowie eine Verbesserung bestehender Anwendungen in Bereichen der Elektrotechnik, des Maschinenbaus, der Informationstechnologie und der biomedizinischen Diagnostik entstehen [138]. Viele Produkte mit nanotechnologischem Einfluss haben schon seit einigen Jahren Einzug in industrielle Verarbeitungen und unser alltägliches Leben gefunden. So werden beispielsweise Titandioxid-Nanopartikel oder Zinkoxid-Nanopartikel in Sonnencremes eingesetzt, wodurch die schädigende UV-Strahlung absorbiert oder reflektiert wird. Siliziumdioxid-Nanopartikel (E551) werden unter anderem in der Lebensmittelindustrie als Fließregulierungsmittel eingesetzt, um die Fließ- bzw. Rieseigenschaften von Salz zu verbessern. Silber-Nanopartikel wirken antimikrobiell. Aus diesem Grund werden sie u.a. in der Textilherstellung verwendet oder sogar in Waschmaschinen (Nano Health System®, Samsung). Diese Entwicklung wird von Ökotoxikologen kritisch begleitet, da Silber-Nanopartikel, die von Waschmaschinen freigesetzt werden und in das Abwasser gelangen, sich in Kläranlagen anreichern könnten. Dies könnte zum Absterben der für den Klärprozess essenziellen Bakterien führen. In der pharmazeutischen Industrie sowie in der Lack- und Farbenbranche werden u. a. Titandioxid-, Titannitrid- und Zirkonnitrid-Nanopartikel als Farbpigmente eingesetzt. Kohlenstoff-Nanopartikel werden aufgrund ihrer Leitfähigkeit als Bestandteile von Kunststoffen eingesetzt. Durch magnetische Nanopartikel sollen Krebszellen mittels Hyperthermie zerstört werden [139]. Auf diesem Gebiet wurden bereits präklinische Studien durchgeführt. Klinische Studien sind in Bearbeitung. Mizellare PEG-Copolymer-Nanopartikel wurden von amerikanischen Forschern querschnittsgelähmten Ratten injiziert. Dabei fanden Sie heraus, dass die Nanopartikel die Regeneration der beschädigten Nervenzellen erheblich steigerten [140]. Ein weiterer Ansatzpunkt für den Transport von

Arzneistoffen im Körper wird mit nanoskaligen Kohlenstoffröhren (carbon nanotubes) untersucht [141, 142].

Neben den neuen, vielversprechenden Möglichkeiten, welche sich durch die Nanotechnologie ergeben, werden allerdings auch neue Gefahren für die menschliche Gesundheit geschaffen. Während des Produktionsprozesses, des Transportes oder der Anwendung der Partikel können sie in die Umwelt gelangen. Da industriell synthetisierte Nanopartikel oftmals völlig neue Partikel mit bisher unbekannten Eigenschaften darstellen, können noch keine oder nur äußerst grobe Abschätzungen ihres toxischen Potenzials generiert werden. So besteht die Gefahr, dass Nanopartikel in Tonnen ihren Weg in die verarbeitende Industrie finden, bevor ihr teilweise riskantes Potenzial erkannt wird. Viele Technologiefirmen arbeiten absichtlich wenig transparent, da befürchtet wird, dass Nanoprodukte ein ähnliches Schicksal erleiden wie genveränderte Produkte; zumal seit den Diskussionen in letzter Zeit Stimmen laut werden, die eine Kennzeichnungspflicht für Nanobestandteile fordern. Es wird teilweise befürchtet, dass sich Nanopartikel als das "neue Asbest" herausstellen könnten. Im Falle von Kohlenstoff-Nanoröhren, eines der vielversprechendsten und oft genutzten Nanomaterialien, gibt es erste Anzeichen, dass sie toxikologisch ähnlich wie Asbest wirken können [143]. Außerdem zeigten Versuche an Ratten, dass eingeatmete Kohlenstoff-Nanoröhren über den Riechnerv ins Gehirn wandern [144].

NP kommen in der Umwelt normalerweise nicht als einzelne nanogroße Partikel vor, sondern treten als Aggregate auf. Da die Deposition in der Lunge von der Größe des inhalierten Partikels abhängt, kann sie durch Aggregation der Partikel verändert werden. Auch die Aufnahme von Partikeln in verschiedene Zellen ist von der Größe der Partikel abhängig [145]. Ein Aggregat vieler Nanopartikel verhält sich jedoch nicht wie ein einzelner Mikropartikel, welcher der Größe des Aggregats entspricht. NP-Aggregate beinhalten die Toxizität der einzelnen nanogroßen Partikel [146]. Die Autoren erklären dies mit der großen Oberfläche der nanogroßen Partikel, welche in einem Aggregat erhalten bleibt (im Vergleich zu einem einzelnen Partikel mit gleicher Größe). Da Partikel über ihre Oberfläche mit der direkten Umwelt interagieren können, kann diese große Oberfläche eines Partikel-Aggregats zu höheren toxischen Auswirkungen führen.

Epidemiologische Studien zeigen, dass durch ultrafeine Partikel (PM 0,1; Particulate Matter) nicht nur die pulmonale sondern auch die kardiovaskuläre Mortalität erhöht wird [147]. Toxikologische Daten weisen darauf hin, dass kardiovaskuläre Wirkungen direkt durch Partikel oder deren lösliche Bestandteile aber auch durch eine pulmonale Entzündungsantwort bzw. eine systemische Akutphase-Reaktion des Körpers über

vegetative Störungen, endotheliale Dysfunktion, Blutgerinnungsneigung sowie durch Ionenkanalstörungen am Herzen vermittelt werden können [148].

2.8.1 Toxizitätsuntersuchungen

21 % aller Tierversuche in Deutschland sind für die vorgeschriebenen toxikologischen oder andere Sicherheitsüberprüfungen von Arzneimitteln und Medizinprodukten benutzt worden. Laut Angaben des Verbandes forschender Arzneimittelhersteller (VFA) entfallen 86 % der im pharmazeutischen Bereich durchgeführten Tierversuche auf die Überprüfung von Arzneimitteln auf ihre Unbedenklichkeit, Qualität und Wirksamkeit (Pharmaforschung).

Durch Inkrafttreten der EU-Richtlinie 86/609/EWG (Schutz von Versuchstieren) sollen verstärkt *In-vitro*-Methoden wie Zell- und Gewebekulturen als alternative Testverfahren zu Tierversuchen eingesetzt werden. Diese Richtlinie soll das 1959 von Russel und Burch aufgestellte „3-R-Konzept“ (*Reduction, Refinement, Replacement*) praktisch umsetzen. *Reduction* steht dabei für das Ziel die Anzahl der Versuchstiere zu verringern und ihr Leiden zu mindern. *Refinement* meint eine Verbesserung der Versuchsdurchführung und *Replacement* steht für den Ersatz von Tierversuchen durch *In-vitro*- oder *In-silico*-Tests (Computermodelle).

Damit die Richtlinie umgesetzt werden kann, wird seit einigen Jahren verstärkt an Alternativmethoden geforscht sowie die *In-vitro* – *in vivo* Korrelation überprüft. Für pulmonale Fragestellungen stehen zum Beispiel über 23 verschiedene Zelllinien zur Verfügung [149]. In der vorliegenden Arbeit wurden humane alveoläre Epithelzellen (A549) verwendet, da diese Zelllinie im Fraunhofer ITEM seit Jahren etabliert ist und die gewonnenen Daten mit historischen Daten verglichen werden könnten. Neben Zelllinien kommen oftmals auch Primärzellen, wie z. B. primäre humane Bronchialepithelzellen, welche per Bronchialbürstung von gesunden Spendern gewonnen wurden, zum Einsatz [150]. Die Arbeitsgruppe um Sayes untersuchte u. a. die nanopartikuläre Toxizität von Zinkoxid an der pulmonalen Epithelzelllinie L2, an primären alveolaren Makrophagen und an einer Kokultur von beiden Zellen. Parallel untersuchte die Gruppe die Toxizität der Nanopartikel nach intratrachealer Instillation an Ratten. Im Anschluss verglichen sie *In-vitro*- und *In-vivo*-Resultate und korrelierten ihre Ergebnisse. Sayes und Kollegen folgerten aus ihren Experimenten, dass Übereinstimmungen vorhanden sind, aber noch weitere Validierungsarbeit nötig ist, um ein aussagekräftigeres *In-vitro*-System zu erhalten [151]. Die Forschergruppe um Corsini analysierte das allergene und zytotoxische Potenzial von Kontaktallergenen, respiratorischen Allergenen und Irritantien an der humanen Keratinozytenzelllinie NCTC2455 sowie an humanen primären Keratinozyten und verglich ihre Ergebnisse mit denen der alternativen

In-vivo-Methode des lokalen Lymphknotenassays (LLNA, *local lymph node assay*) [152]. Ihre *In-vitro*-Resultate lieferten komplementäre Ergebnisse in Bezug auf den LLNA.

Weitere Alternativen sind *Ex-vivo*-Methoden, wie z. B. Präzisionslungenschnitte (PCLS, *precision-cut lung slices*), die u. a. für (immun-)toxikologische Untersuchungen geeignet sind [153]. Der Vorteil dieser Gewebekulturen verglichen mit Monokulturen ist, dass nicht nur ein Zelltyp vorliegt, sondern viele verschiedene die miteinander interagieren können. So liegen bei PCLS (im Vergleich zu den A549-Zellen) neben Epithel- auch Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Basalzellen sowie dendritische Zellen vor [154]. Eine *Ex-vivo*-Möglichkeit, den Arzneistofftransport und die Verteilung des Wirkstoffs in der Lunge zu untersuchen, bietet das Modell der isolierten, perfundierten Lunge [155]. Trifilieff *et al.* studierten die Rolle des Sphingosinrezeptors an parenchymalen Lungenstreifen von Ratten, die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden [156]. Die Arbeitsgruppe um Morin untersuchten an organotypischen Atemwegsexplantaten elektrophysiologische und pharmakomechanische Wirkungen, welche durch exzitatorische und inhibitorische Stimuli induziert wurden [157].

Mit der Erforschung, Entwicklung, Bewertung und Validierung alternativer Methoden zum Tierversuch beschäftigt sich das Europäische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (ECVAM). Diese Institution hat eine Internet-Datenbank mit tierversuchsfreien Testmethoden zusammengestellt. So sind zum Beispiel die folgenden Tests bei der Zulassung von Arzneistoffen und Chemikalien in Bezug auf die haut- und augenreizende Wirkung behördlich anerkannt und bieten eine Alternative zum Draize-Test: der HET-CAM-Test am bebrüteten Hühnerei, der BCOP (*bovine cornea opacity and permeability*)-Test, der IRE (*isolated rabbit eye*)-Test an Kaninchenaugen und der ICE (*isolated chicken eye*)-Test am Hühnerauge. Die Augen stammen dabei jeweils aus Schlachthofmaterial. Eine anerkannte tierversuchsfreie Prüfung von Substanzen auf Reproduktionstoxizität ist der embryonale Stammzell-Test (EST). Aufgrund der Vielfalt von Alternativmethoden, deren Beschreibung den Rahmen sprengen würde, sollen die oben genannten nur beispielhaft erwähnt sein.

In-vitro-Methoden werden in der Zukunft preiswerter und schneller durchzuführen sein als Tierversuche. Ein viel versprechendes Modell für die Erforschung des toxischen Potenzials von Substanzen bietet der „Organismus mit Stoffwechsel auf einem Mikrochip“. Dabei sind winzige Kammern aus Glasröhren mit lebenden Zellen von verschiedenen Organen ausgekleidet, die den Organismus nachahmen sollen [158, 159].

Für die Zulassung neuer Arzneistoffe und Arzneistoffträgersysteme durch die FDA oder EMA sind akute Toxizitätsstudien an mindestens zwei verschiedenen Spezies erforderlich um deren Unbedenklichkeit zu bescheinigen.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung

Zur Herstellung fester Lipidnanopartikel können verschiedene Verfahren angewendet werden, wie zum Beispiel die Mikroemulsionstechnik [160], die Solvent-Injection-Methode [161], die Solvent-Evaporation-Technik [162] oder die Doppel-Emulsions-Methode [163]. Das gängigste Verfahren zur Herstellung fester Lipidnanopartikel ist jedoch die Hochdruckhomogenisation unter Verwendung eines Kolben-Spalt-Homogenisators [164]. Die Hochdruckhomogenisation ist ein Verfahren, das die Produktion der Nanosuspensionen auch in großem Umfang erlaubt und ein Scale-Up von Labor- auf Industriegeräte leicht möglich macht [107].

Prinzip:

Ein Hochdruckhomogenisator besteht grundsätzlich aus einer Kolbenpumpe mit einem nachfolgenden Hochdruckventil. Die Hochdruckpumpe muss dabei genügend Druck aufbringen, um das Gut durch das Homogenisierventil zu drücken. Das Homogenisierventil besteht aus einem festen Ventilsitz und einem variabel einstellbaren Ventil. Beide Komponenten bilden einen radialen, einstellbaren Spalt. Der Spalt und als Folge die Widerstände, die dort vorherrschen, beeinflussen den Homogenisierdruck. Ein weiteres Bauelement der Homogenisiereinheit ist ein sogenannter *Impact Ring*, der die Form des Auslasses bestimmt.

3.1.1 Herstellung der arzneistofffreien Lipidmatrix

Phospholipon 90 G (P90G)	Phospholipid, Köln, Deutschland
Softisan 154 (S154)	Condea, Witten, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung und Temperaturfühler	IKA, Staufen, Deutschland
Laborglasflasche braun	Schott, Mainz, Deutschland

Die in der Dissertation untersuchte Lipidmatrix (LM) bestand aus 70 % (m/m) S154 und 30 % (m/m) P90G. Beide Bestandteile wurden in eine Braunglasflasche gegeben und bei 70 °C geschmolzen. Diese Schmelze wurde so lange mit einem Teflon-beschichteten Rührmagneten gerührt, bis eine klare, gelbe Lösung entstanden war. Zur Abkühlung wurde die Lösung bis zu ihrer Verfestigung weitergerührt.

Die Benennung der LM erfolgte nach ihrer Phospholipidkonzentration (LM30).

3.1.2 Herstellung der arzneistoffhaltigen Lipidmatrix

Dexamethason	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dexamethason-21-dinatriumphosphat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Die Lipidmatrix wurde wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben hergestellt. Zur Inkorporation von Dexamethason und Dexamethason-21-dinatriumphosphat in die LM wurden beide Arzneistoffe jeweils direkt in der Schmelze der Lipidmatrix gelöst. Die maximal solubilisierbare Arzneistoffkonzentration wurde bei 70 °C makroskopisch bestimmt.

3.1.3 Herstellung der arzneistofffreien Nanosuspension

Lipidmatrix (LM30)

Solutol HS 15 (Emulgator)	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
---------------------------	---------------------------------

Aqua bidestillata

Hochleistungsdispersierger (Ultra Turrax)	IKA, Staufen, Deutschland
---	---------------------------

Magnetrührer mit Heizung und Temperaturfühler	IKA, Staufen, Deutschland
---	---------------------------

Hochdruckhomogenisierer:

Emulsiflex-C5	Avestin, Ottawa, Kanada
---------------	-------------------------

Panda	Niro Soavi S.p.A., Parma, Italien
-------	-----------------------------------

Laborglasflasche braun	Schott, Mainz, Deutschland
------------------------	----------------------------

Die Formulierung der SLN bestand aus 15 % LM, 3 % Emulgator und 82 % Aqua bidestillata (alle Einwaagen m/m). Die LM enthielt 30 % P90G. Alle Bestandteile wurden in Laborglasflaschen eingewogen und bei 70 °C geschmolzen. Anschließend wurde eine heiße Präemulsion mit Hilfe eines Ultra Turrax bei 13.000 U/Min. für 5 Minuten hergestellt. Die heiße Präemulsion wurde dann in den Hochdruckhomogenisator gegeben und bei circa 65 °C und 1000 bar in 20 Zyklen homogenisiert. Das Gerät ist in Abb. 3 dargestellt. Abschließend wurden die Emulsionen bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine Rekristallisation zu SLN zu ermöglichen. Das Probenvolumen variierte zwischen 15 und 50 ml.

Alternativ zu der Herstellung mit dem Emulsiflex-C5-Kolben-Spalt-Homogenisator wurden die heißen Präemulsionen mit dem Homogenisator Panda mit zwei Kugelventilen bei circa 65 °C und 300 bar für 50 min homogenisiert.

Die Benennung der SLN erfolgte nach der Phospholipidkonzentration. Bei der Herstellung der SLN30 wurde folglich LM30 verwendet.



Abb.3: Avestin Emulsiflex-C5-Hochdruckhomogenisator

3.1.4 Herstellung der arzneistoffhaltigen Nanosuspension

Dexamethason

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Nachdem der Arzneistoff in der Schmelze der LM solubilisiert wurde und die entsprechenden Mengen Aqua bidest. und Emulgator hinzugefügt wurden, konnte die Mischung wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben hochdruckhomogenisiert werden.

3.1.5 Herstellung der fluoreszenzfarbstoffmarkierten Nanosuspension

Fluoreszenzfarbstoffe:

Coumarin-6	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
(3-(2-Benzothiazolyl)-7-(diethylamino)coumarin)	
Dil	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
(1,1'-Dioleyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninmethylsulfonat)	
DiD	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
(1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat)	

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden jeweils in die Schmelze der LM gegeben und nach Zusatz von Aqua bidest. und Emulgator, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, hochdruckhomogenisiert.

Eine weitere Möglichkeit, die auch im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde und zu vergleichbaren Resultaten führt, besteht darin, die Fluoreszenzfarbstoffe nach der Herstellung zu den noch warmen Nanosuspensionen hinzuzufügen. Während des anschließenden Kristallisationsprozesses, in dem sich die SLN bilden, wird der Farbstoff in den Partikel eingebaut oder adsorbiert.

In Abb. 4 sind die fluoreszenzfarbstoffmarkierten Nanosuspensionen dargestellt. Die farblose Nanosuspension zeigt eine normale unmarkierte SLN30-Nanosuspension. Die gelbgrünlichfluoreszierende Nanosuspension wurde mit Coumarin-6 markiert. In die pinkfarbene Nanosuspension wurde Dil inkorporiert. Die blaufluoreszierende Nanosuspension wurde mit DiD markiert.



Abb. 4: Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Nanosuspensionen

Die Anregungswellenlänge für Coumarin-6 lag bei 444 nm, für DiI bei 549 nm und für DiD bei 644 nm. Die Emissionswellenlänge lag für Coumarin-6 bei 505 nm, für DiI bei 565 nm und für DiD bei 665 nm.

3.2 Sterilisierung der Nanosuspensionen

Gammacell 2000

Mølsgaard Medical, Hørsholm, Dänemark

Um eine mikrobiologische Kontamination der *In-vitro*-, *Ex-vivo*- und *In-vivo*- Versuche durch die Nanosuspensionen auszuschließen, wurden diese nach der Herstellung mit einer ¹³⁷-Cäsiumquelle bestrahlt. Die Dosis der γ -Bestrahlung betrug 150 Gy.

3.3 Physikochemische Untersuchungen

Das physikochemische Verhalten der LM und der daraus hergestellten SLN wurde durch die im Folgenden dargestellten Methoden näher charakterisiert.

3.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Zetasizer Nano ZS Malvern, Herrenberg, Deutschland

Polycarbonatküvetten Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Aqua bidestillata

Die PCS, auch dynamische Lichtstreuung (DLS) genannt, ist ein dynamisches Streulichtverfahren zur Bestimmung von Partikelgrößen im Submikronbereich. Dabei wird die Streuung von Laserlicht an dispergierten Partikeln genutzt, die aufgrund der Brownschen Molekularbewegung der Dispersionsmittelmoleküle im Dispersionsmedium diffundieren. Infolge der Teilchenbewegung ergeben sich zeitabhängige Intensitätsschwankungen der gemessenen Streulichtintensität. Je kleiner das Partikel, desto größer ist die Diffusionsgeschwindigkeit. Die gemessenen zeitabhängigen Intensitätsschwankungen sind daher bei kleineren Teilchen stärker ausgeprägt als bei größeren.

Mit Hilfe der PCS wurde der hydrodynamische Durchmesser (*z-average*) und der Polydispersitätsindex (PI) der SLN bestimmt. Der PI ist ein Maß für die Größenverteilung der Nanopartikel, wobei theoretisch Werte zwischen 1 (maximale Streuung) und 0 (identische Größe aller Partikel) möglich sind. Die Nanosuspensionen wurden vor den Messungen mit filtriertem, bidestilliertem Wasser so lange verdünnt, bis eine optimale Verdünnung erreicht wurde (ca. 1 : 500). Die Proben wurden bei einer Temperatur von 25 °C und bei einem Winkel von 173° (NIBS = *non-invasive backscatter detection*) detektiert. Die NIBS-Technologie verkürzt den Weg des Streulichtes durch die Probe und verringert dadurch das Risiko der Mehrfachstreuung. Jede Messung wurde mindestens in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.3.2 Zetapotenzial (Laser-Doppler-Anemometrie)

Zetasizer Nano ZS

Malvern, Herrenberg, Deutschland

Polycarbonatküvetten

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Aqua bidestillata

Prinzip:

Das Zetapotenzial ist das elektrische Potenzial, auch Coulomb-Potenzial genannt, an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in Suspension. Es beschreibt die Fähigkeit eines von einer Ladung hervorgerufenen Feldes, Kraft auf andere Ladungen auszuüben. Die Differenz des elektrischen Potenzials an zwei Orten ist die elektrische Spannung. Befinden sich geladene Partikel in Suspension, wird deren Potenzial durch Anlagerung von Ionen im Suspensionsmedium kompensiert. Auf der Partikeloberfläche lagern sich fest gebundene Ionen in der sogenannten Helmholtz-Schicht an. Weitere Ionen lagern sich eher locker gebunden in einer ungeordneten Schicht an. Das Partikel erscheint aus großer Entfernung elektrisch neutral. Bewegt sich das Partikel, wird durch Reibung ein Teil der locker gebundenen Schicht abgeschert, und es erscheint nicht mehr elektrisch neutral, sondern besitzt wieder ein Potenzial, das Zetapotenzial. Es ist bei gleichem Medium eine relative Messgröße für das Oberflächenpotenzial und somit für die Ladung des Partikels.

Das Zetapotenzial ist ein Maß für die Abstoßung oder Anziehung zwischen Partikeln, wodurch man Aussagen über Stabilität von Formulierungen treffen kann. Das Messprinzip beruht darauf, dass in einem von außen angelegten elektrischen Feld die geladenen Teilchen zur entgegengesetzt geladenen Elektrode wandern. Mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie wird über die elektrophoretische Mobilität der Partikel im elektrischen Feld das Zetapotenzial ermittelt.

Durchführung:

Die Proben wurden mit filtriertem, bidestilliertem Wasser verdünnt und vermessen. Jede Messung wurde mindestens in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer Frequenz von 1000 Hz und einer angelegten Spannung von 150 V.

3.3.3 Polarisationsmikroskopie

Photomikroskop Typ III	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Heiztisch FP 52 mit Steuergerät FP 5	Mettler, Gießen, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Photomikroskop durchgeführt, welches mit gekreuzten Polarisatoren ausgestattet ist. Schwarzweiße Texturen erscheinen durch Erzeugung eines zusätzlichen Gangunterschiedes von 550 nm mittels eines Lambda-Plättchens farbig. Um temperaturabhängige Effekte zu beobachten, wurde ein Heiztisch mit Steuereinheit verwendet.

3.3.4 Röntgendiffraktometrie

Röntgendiffraktometrie, auch Röntgenbeugung genannt, wird unter anderem zur Charakterisierung und Feinstrukturuntersuchung von Substanzen und Zubereitungen angewandt. Durch die Bestimmung der Kristallgitterzustände in zu untersuchenden Proben mittels Röntgendiffraktometrie kann eine Aussage über deren Kristallinitätsgrad und Kristallmodifikation getroffen werden. Die für diese Untersuchungsmethode erforderliche Röntgenstrahlung wird durch eine Röntgenröhre erzeugt. Durch Beschuss einer Zielanode mit hochenergetischen Elektronen aus einem Kathoden-Glühdraht wird sowohl eine kontinuierliche als auch eine charakteristische Röntgenstrahlung des Anodenmaterials erzeugt. Als Anodenmaterialien werden häufig Kupfer (Cu), Chrom (Cr), Eisen (Fe) und Kobalt (Co) verwendet. Um mit monochromatischer Röntgenstrahlung arbeiten zu können, wird z.B. eine Nickelfolie als Kristallmonochromator (bei Cu K_α -Strahlung) zwischen Röntgenröhre und Probe gebracht, damit der Anteil an K_β -Strahlung nahezu ausgeblendet wird. Die Berechnung von Kristallgitterabständen aus den registrierten Interferenzen erfolgte über die Bragg'sche Gleichung:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Dabei stellt n die Ordnung der Interferenz dar, λ die Wellenlänge der eingesetzten Röntgenstrahlung, d den Gitterabstand (Netzebenenabstand) und θ den Winkel dar, unter dem ein Interferenzmaximum auftritt.

Bei der Röntgendiffraktometrie unterscheidet man zwei Arten: die Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD, *wide-angle X-ray diffraction*) und die Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (SAXD, *small-Angle X-ray diffraction*). Wegen der zunehmenden regulatorischen Anforderungen an einen neuen Arzneistoff hat vor allem WAXD eine sehr

große Bedeutung in der pharmazeutischen Industrie erlangt, da mit dieser Methode unterschiedliche Kristallmodifikationen unterschieden werden können. Für die Charakterisierung flüssigkristalliner Systeme wird häufig SAXD eingesetzt. Die Reflexfolge im Streubild ist charakteristisch für die Art des vorliegenden Flüssigkristalls (z. B. lamellar, hexagonal, kubisch). Zusätzlich kann aus der Reflexposition auf die Größe des Gitterabstandes geschlossen werden [165].

3.3.4.1 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)

Röntgengoniometer: X'Pert Pro	PANalytical, Kassel, Deutschland
Detektor: X'Celerator PW 3015/20	PANalytical, Kassel, Deutschland
Röhre PW 3373/00 (Kupferanode)	PANalytical, Kassel, Deutschland

Die Untersuchung von Kristallgitterabständen der Nahordnung erfolgte mit WAXD. Die Lipidmatrices wurde in einen Aluminiumträger eingeschmolzen, die Nanosuspensionen in den Träger hinein pipettiert und mit dem Röntgengoniometer vermessen. Der Generator wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 40 mA betrieben und lieferte Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 0,1542$ nm. Die Messungen wurden bei $3-45^\circ$ 2 Theta ($0,0017^\circ/15$ sec) durchgeführt. Die Kristallgitterabstände wurden mit Hilfe der Bragg'schen Gleichung bestimmt.

3.3.4.2 Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (SAXD)

Kiessig-Kamera	Institutseigenbau, TU-Braunschweig
Röntgeneratore PW 1730	Philips, Kassel, Deutschland
Röhre PW 2213/20 (Kupferanode)	PANalytical, Kassel, Deutschland
Kaptonfolien	Krempel, Kuppenheim, Deutschland
Detektor OED 50 M	M.Braun, Garching, Deutschland
ASA-SAX-Karte	M.Braun, Garching, Deutschland

Die SAXD-Aufnahmen wurden mit einer Kiessig-Kamera durchgeführt. Der Generator wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 25 mA betrieben und lieferte Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 0,1542$ nm (Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung). Die Proben mit einer Schichtdicke von 1 mm befanden sich in einem

würfelförmigen Probenhalter (Institutseigenbau) zwischen zwei röntgen-amorphen Kaptonfolien. Die Messungen fanden im Vakuum bei Raumtemperatur statt. Die Detektion erfolgte mittels eines ortsempfindlichen Detektors. Die Datenübertragung zum Computer erfolgte mit einer ASA-SAX-Karte. Die Kristallgitterabstände wurden mit Hilfe der Bragg'schen Gleichung bestimmt.

3.3.5 Fluorimetrische Bestimmung der Inkorporationseffizienz

Fluoreszenz-Spektrophotometer	Hitachi, Tokio, Japan
Polycarbonatküvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Vivaspin-Zentrifugalkonzentratoren 6 ml, 20 ml	Sartorius, Göttingen, Deutschland
(Molecular Weight Cut Off, MWCO = 300.000 Da)	

Prinzip:

Fluoreszenz lässt sich sehr gut zum selektiven Nachweis von Verbindungen verwenden. Die nachzuweisenden Moleküle werden mit Licht (im UV- oder sichtbaren Wellenlängenbereich) angeregt und emittieren Strahlung mit einer längeren Wellenlänge. Da die Emission in alle Raumrichtungen erfolgt, kann ihre Messung im rechten Winkel zum anregenden Lichtstrahl erfolgen. Dies hat den großen Vorteil, dass Verbindungen, die das einstrahlende Licht absorbieren, nicht stören können. Die Methode ist dadurch relativ unempfindlich gegenüber Trübungseinflüssen.

Durchführung:

Für die Überprüfung der Inkorporierungseffizienz der Fluoreszenzfarbstoffe in die SLN wurden die Nanosuspensionen mittels Vivaspin-Konzentratoren einer Zwangsfiltration unterzogen. Bei den Zentrifugalkonzentratoren handelt es sich um ein Zentrifugenröhrchen, in dessen Mitte sich ein senkrecht stehender Membranfilter mit einem MWCO von 300 kDa befindet (Abb. 5). Die Nanosuspensionen wurden für 120 min bei einer Temperatur von 20 °C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 5000 x g zentrifugiert.

Man erhielt ein Filtrat, das partikelfrei war und, sofern vorhanden, den nicht adsorbierten bzw. nicht inkorporierten Anteil des Farbstoffes enthielt. Die SLN mit dem adsorbierten bzw. inkorporierten Farbstoff wurden vom Filter zurückgehalten. Das Filtrat wurde anschließend fluorimetrisch vermessen.



Abb. 5: Vivaspin 20 ml Zentrifugalkonzentrator

3.3.6 Bestimmung der Arzneistoffbeladungsrate

Zentrifuge Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Vivaspin-Zentrifugalkonzentratoren 6 ml, 20 ml Sartorius, Göttingen, Deutschland

(Molecular Weight Cut Off, MWCO = 300.000 Da)

Instrumentelle Bedingungen

HPLC-Anlage: Waters 2690 Alliance Waters, Eschborn, Deutschland

Detektor: Dioden-Array-Detektor (Waters 996) Waters, Eschborn, Deutschland

Detektionswellenlänge: UV 254 nm

Pumpe: Waters 515 Waters, Eschborn, Deutschland

Injektor: Waters WISP 712 Waters, Eschborn, Deutschland

Säule: LiChrospher (100 RP-18, 5 μ m, 250 x 4 mm) Merck, Darmstadt, Deutschland

Säulentemperatur: 20 °C

Mobile Phase: Methanol : Wasser = 65 : 35 (V/V) + 7,5 mMol Kaliumdihydrogenphosphat

Fließgeschwindigkeit: 1,0 ml/min

Auswertungssoftware: Millenium 32 Waters, Eschborn, Deutschland

Mehrpunktkalibrierung im Bereich 1-20 μ g/ml ($R^2 > 0,999$)[^]

Quantifizierungsgrenze (LOQ): 1,012 μ g/ml

Nachweisgrenze (LOD): 0,026 μ g/ml

Für die Ermittlung der Arzneistoffbeladungsrate der SLN wurden die Nanosuspensionen mittels Vivaspin-Konzentratoren einer Zwangsfiltration unterzogen (siehe Methode 2.3.5,

Abb. 4). Anschließend wurde das Filtrat per HPLC auf Dexamethason untersucht. So konnte durch Differenzbildung auf die Beladung der Partikel zurückgeschlossen werden.

3.4 *In-vitro*-Untersuchungen

3.4.1 A549-Zellkultur

A549-Zellen	ATCC, Rockville, MD, USA
DMEM	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	Lonza, Visp, Schweiz
50 ml PP-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 10 ml Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
T75-Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Die A549-Zelllinie wurde im Jahr 1972 aus dem Lungenkarzinom eines 58-jährigen, männlichen, kaukasischen Patienten isoliert. Es handelt sich dabei um alveoläre Epithelzellen, die viele Merkmale von Typ-II-Pneumozyten aufweisen. Die Zellen bilden einen Monolayer mit einer Verdopplungszeit von circa 30 Stunden.

Die konfluenten Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Hierbei wurden 10 % der Zellen wieder in eine neue Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm²) mit 20 ml Kulturmedium überführt. Für die Kultur der Zelllinie wurde DMEM-Medium verwendet, welches mit 10 % FKS angereichert war. Für Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben sind, wurden A549-Zellen der Passagen 5-80 genutzt. 100.000 Zellen pro Vertiefung wurden in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen in 200 µL Medium überführt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Experimente durchgeführt.

3.4.2 RAW-Zellkultur

RAW-264.7-Zellen	ATCC, Rockville, MD, USA
RPMI	Lonza, Visp, Schweiz
Natriumcarbonat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Cambrex, Oberhaching, Deutschland
Glucoselösung 10 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
50 ml PP-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
25 ml / 10 ml Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
T75-Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Objektträger mit Kammerkonstruktion für 8 Vertiefungen (LabTek Chamber Slide System)	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Die RAW-264.7-Zelllinie wurde 1978 mittels des *Abelson murine leukemia virus* hervorgebracht. Es handelt sich hierbei um murine makrophagenähnliche Zellen. Die Zellen bilden einen Monolayer mit einer Verdopplungszeit von circa 38 Stunden.

Die konfluenten Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Hierbei wurden 20 % der Zellen wieder in eine neue Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm²) mit 20 ml Kulturmedium überführt. Für die Kultur der Zelllinie wurde RPMI-Medium verwendet, welches mit 10 % FKS, 4,5 g/L Glucose, 1,5 g/L Natriumcarbonat, 10 mM HEPES und 1,0 mM Natriumpyruvat angereichert war. 150.000 Zellen pro Kammer wurden in einem 8-Kammer-Objektträger in 400 µL Medium überführt. Diese Vorgehensweise bot den Vorteil, dass die Zellen direkt auf den Objektträgern wuchsen und nach Abschluss der Exposition und Färbung die Kammerkonstruktion auf dem Objektträger schnell entfernt und die Zellen anschließend unter dem Mikroskop beobachtet werden konnten. Die Experimente wurden nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank durchgeführt.

3.4.3 Isolation und Kultivierung von Alveolarmakrophagen (AM)

BALB/cAnNCrI-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Ethanol 70 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI	Lonza, Visp, Schweiz
PBS	Lonza, Visp, Schweiz
Pentobarbital-Natrium (Narcoren)	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Zellzählgerät CASY TT	Innovatis, Reutlingen, Deutschland
Spritze 1 mL	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkatheter Abbocath-T G20	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)	Hammacher, Solingen, Deutschland
Objektträger mit Kammerkonstruktion für 8 Vertiefungen (LabTek Chamber Slide System)	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Für die Aufnahmeversuche mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten SLN wurden u. a. Alveolarmakrophagen benutzt. Die Alveolarmakrophagen wurden aus naiven BALB/c-Mäusen isoliert.

Die Tiere wurden mit einer i.p. Überdosis Pentobarbital-Na (1/5 verdünnt mit PBS, 250 µL pro Maus) eingeschläfert. Als nächstes wurde mit einer spitzen Schere ein Loch in das Zwerchfell geschnitten, damit die Lungenflügel kollabierten und beim Öffnen des Brustkorbes nicht beschädigt wurden. Danach wurde die Trachea frei präpariert, ein Katheter vorsichtig in die Trachea eingeführt und mit einem chirurgischen Faden fixiert. Über diesen Katheter wurde die Lunge 5-mal mit 0,8 ml eiskühlem PBS gespült. Angesichts der Tatsache, dass über 90 % der Alveolarzellen in naiven Tieren Makrophagen darstellen (siehe Abb. 27 Reinluftkontrolle), wurden diese durch das mehrmalige Spülen größtenteils aus dem Alveolarraum lavagiert. Die gewonnene bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) wurde in ein 5 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und für die Ermittlung der Zellzahl wurden die zellulären Rückstände in 500 µl PBS resuspendiert und am Casy Cell Counter gezählt.

Für die Kultur der Primärzellen wurde RPMI-Medium verwendet, welches mit FKS, Glucose, Natriumcarbonat, HEPES und Natriumpyruvat supplementiert war (siehe 2.4.2). 150.000 Zellen pro Kammer wurden in einem 8-Kammer-Objektträger in 400 µl Medium überführt.

Die Experimente wurden nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank durchgeführt.

3.4.4 Gewinnung von Knochenmark generierten dendritischen Zellen

BALB/cAnNCrI-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Ethanol 70 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital-Natrium (Narcoren)	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
CD11c-APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD86-FITC, CD40-FITC, CD80-FITC, MHC II	NatuTec, Frankfurt/M, Deutschland
Zellzählgerät CASY TT	Innovatis, Reutlingen, Deutschland
Spritze 1 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)	Hammacher, Solingen, Deutschland
TCM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Visp, Schweiz
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Objektträger mit Kammerkonstruktion für 8 Vertiefungen (LabTek Chamber Slide System)	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Dendritische Zellen (DC) aus dem Knochenmark wurden nach der Methode von Lutz *et al.* generiert [166]. Dabei wurden die Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia von naiven BALB/c herausgespült und nach Hämolyse der Erythrozyten in Zellkulturmedium resuspendiert. Das Medium, welches auf RPMI-Basis war, wurde mit 5 % FKS, 50 µM β-

Mercaptoethanol und 1 % Antibiotikum (10000 Einheiten Penicillin, 10 mg Streptomycin) sowie GM-CSF supplementiert. In einer Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen wurden 500.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 10 Tage kultiviert, wobei nach dem dritten und sechsten Tag das Medium erneuert wurde. 24 Stunden vor Exposition wurden 85.000 DC in einen 8-Kammer-Objektträger mit 400 µl Medium überführt.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten Zellen um DC handelt, wurde diese mit LPS stimuliert und die Expression ihrer Oberflächenmerkmale untersucht. Dazu wurden die Zellen am neunten Tag mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Am nächsten Tag wurden die DC geerntet und mit folgenden monoklonalen Antikörpern 30 min gefärbt: CD11c-APC, CD86-FITC, CD40-FITC, anti-MHC class II-PE, CD80-FITC oder -PE. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Diese Untersuchung ergab, dass die Zellen die typischen Oberflächenmerkmale von DC exprimierten: CD11c, CD40, CD80 und CD86.

3.4.5 Vitalitätsmessungen

Vitalitätsbestimmungen dienen der indirekten Erfassung geschädigter und toter Zellen über die Bestimmung metabolischer Zellen. Unter dem Zelltod wird der irreversible Verlust essenzieller zellulärer Funktionen und Strukturen verstanden [167]. Zu dessen Ermittlung gibt es eine Reihe von Methoden, die jeweils unter verschiedenen Aspekten durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden der MTT-Test, der Neutralrot-Test und der WST-1-Test benutzt, um den zytotoxischen Einfluss der SLN zu ermitteln.

3.4.5.1 MTT-Test

MTT	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen)	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Orbitalschüttler	IKA, Staufen, Deutschland
Photometer (ELISA Reader)	Dynatech, Deisendorf, Deutschland
MTT-Stammlösung 5 mg/ml MTT in PBS	
MTT-Reaktionslösung (MTT-Stammlösung 10 % (V/V) in Kulturmedium)	

Prinzip:

Der MTT-Test ist ein Vitalitätstest, welcher größtenteils auf der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen basiert. Die Reaktion des gelben, wasserlöslichen MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zum ringoffenen blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan geschieht unter Oxidation der Pyridinnukleotide Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) (Abb. 6). Diese Reaktion wird von mikrosomalen Enzymen und Enzymen der äußeren Mitochondrienmembran katalysiert. Das gebildete Formazan kann photometrisch bei 540 nm vermessen werden. Hierbei ist die Absorption direkt proportional

zur Aktivität der succinatabhängigen Dehydrogenasen und somit zur Vitalität der untersuchten Zellen (Denizot et al., 1986).

Durchführung:

Der Zytotoxizitätstest wurde nach der Methode von Mosmann durchgeführt [168]. Dabei wurden die Zellen für 24 Stunden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit ansteigenden Konzentrationen an SLN inkubiert. Anschließend wurden 200 µl des MTT-Reaktionsmediums aufgetragen und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Für die Auswertung wurden die Zellen lysiert und der darin befindliche Farbstoff mittels einer salzsauren isopropanolischen Lösung (0,1 % (V/V)) herausgelöst. Der Überstand wurde in eine neue Mikrotiterplatte überführt, anschließend für 15 min auf einem Orbitalschüttler geschwenkt, um eventuell ausgefallene Formazankristalle zu lösen, und photometrisch bei einer Wellenlänge von 555 nm vermessen.

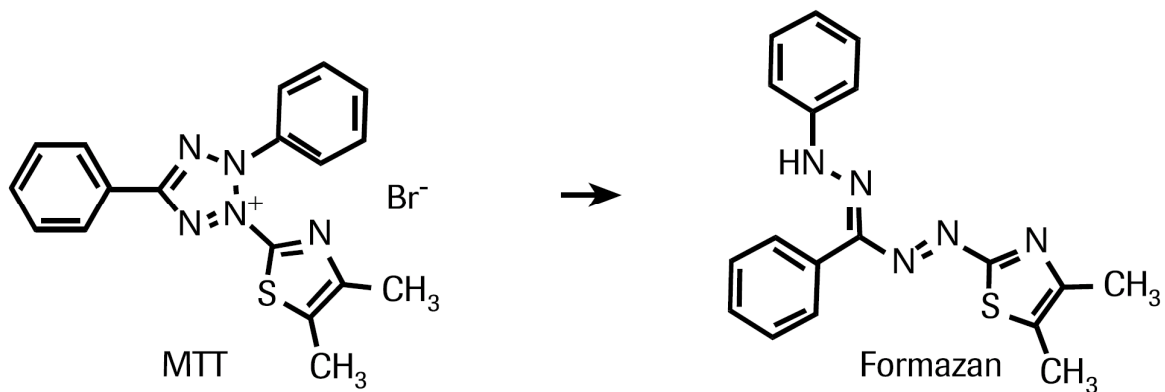


Abb. 6: Reduktive Spaltung des gelben MTT zu blau-violetter Formazan.

3.4.5.2 Neutralrot-Test

Neutralrot	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formalin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen)	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Orbitalschüttler	IKA, Staufen, Deutschland
Photometer (ELISA Reader)	Dynatech, Deisendorf, Deutschland

Prinzip:

Im quantitativen Neutralrot (NR)-Test wird die Membranintegrität nach Noxenexposition untersucht. Dabei wird der leicht kationische Farbstoff (3-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin, bei pH 7,4 ungeladen) während der Inkubationsphase zunächst von allen Zellen aufgenommen, kann dort aber nur an anionische Reste der lysosomalen Matrix gebunden werden. Da in den Lysosomen ein pH-Wert < 5 vorliegt, verfärbt sich der Farbstoff von gelb nach rot. Durch diese Protonierung kann der Farbstoff die Membran nicht mehr durchdringen und wird in diesen Kompartimenten angereichert (Ionenfalle). Durch anschließendes Waschen spült man dann sowohl überschüssigen Farbstoff als auch das NR aus den toten Zellen heraus. Zellen mit intakter Membran haben den Farbstoff aufgenommen und halten ihn zurück. Die Lyse der ehemals lebenden, NR enthaltenden Zellen setzt den Farbstoff frei und ermöglicht so eine quantitative photometrische Bestimmung.

Durchführung:

Der Zytotoxizitätstest wurde nach der Methode von Borenfreund und Puerner durchgeführt [169]. Dabei wurden die Zellen für 24 Stunden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit ansteigenden Konzentrationen an SLN inkubiert. Anschließend wurden 200 μl Neutralrotlösung (Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ in Medium) aufgetragen und die Zellen für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit einer Wasch- und Fixierungslösung, die 1 % Formalin (V/V) enthielt, behandelt. Diese

Lösung wurde nach 2 min wieder entfernt. Als nächstes wurden 200 µl Farbstoffextraktionslösung [50 % (V/V) Ethanol, 1 % (V/V) Eisessig und 49 % (V/V) Wasser] hinzugegeben und für 30 min auf einen Orbitalschüttler gestellt. Abschließend wurde die Absorption bei 540 nm photometrisch vermessen.

3.4.6 Untersuchungen der SLN-Aufnahme in Zellen mittels konfokaler Mikroskopie

Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TO-PRO-3-Iodid	Molecular Probes, Eugene, USA
Rhodaminphalloidin	Molecular Probes, Eugene, USA
PBS	Lonza, Visp, Schweiz
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Konfokales Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM 512 Meta)	Zeiss, Jena, Deutschland
LSM-Meta-512-Software	Zeiss, Jena, Deutschland
IMARIS-4.5.2-Software	Bitplane, Zürich, Schweiz

Die in den 8-Kammer-Objektträgern ausgesäten Zellen wurden mit 400 µl frischem Medium und den fluoreszenzmarkierten Nanosuspensionen versehen und für 6 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um alle nicht inkorporierten bzw. nicht adsorbierten Partikel zu entfernen. Mittels 500 µl Paraformaldehyd (4 %) wurden die Zellen in den 8-Kammer-Objektträgern über 30 min im Dunkeln fixiert. Anschließend wurde der Zellkern mittels TOPRO-3 Iodid (1:500 verdünnt) sowie das Zytoskelett durch Rhodaminphalloidin, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (1 : 100 verdünnt), gefärbt. Danach wurde die Kammerkonstruktion vom Objektträger entfernt und die Objektträger mit den verbleibenden Zellen mikroskopisch untersucht. Repräsentative Bilder wurden mit der Software IMARIS visualisiert.

3.5 *Ex-vivo*-Untersuchungen

3.5.1 Präzisionslungenschnitte

BALB/cAnNCrI-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
DMEM	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EBSS	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Low-melting Agarose	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Streptomycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumbicarbonat-Lösung (7,5 %)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Lonza, Visp, Schweiz
Ethanol 70 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital-Natrium (Narcoren)	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Krumdieck Tissue Slicer	Alabama R&D, Munford, USA
Spritze 1 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Gewebekulturschalen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Venenverweilkatheter Abbocath-T G20	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)	Hammacher, Solingen, Deutschland
Steriles chirurgisches Nahtmaterial	F. Ernst, Hannover, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Die Versuchstiere wurden im Tierhaus des Fraunhofer ITEM unter standardisierten und täglich kontrollierten Bedingungen gehalten (Temperatur: 20-22 °C, Luftdruck: 10 hPa, Luftfeuchtigkeit: 40-70 %, Beleuchtung: 12-h-Tag/Nacht-Rhythmus).

Präparation der Maus:

Die Präparation der Präzisionslungenschnitte (PCLS) erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Martin *et al.* [170]. Für die immuntoxikologische Fragestellung wurde die Methodik leicht abgewandelt. Die Tiere wurden mit einer i.p. Überdosis Pentobarbital-Na (1/5 verdünnt mit PBS, 250 µl pro Maus) eingeschläfert. Anschließend wurde die *Vena cava*

posterior zur Entblutung durchtrennt. Als nächstes wurde mit einer spitzen Schere ein Loch in das Zwerchfell geschnitten, damit die Lungenflügel kollabierten und beim Öffnen des Brustkorbes nicht beschädigt wurden. Danach wurde die Trachea frei präpariert, ein Katheter vorsichtig in die Trachea eingeführt und mit einem chirurgischen Faden fixiert. Die Lunge wurde über den Katheter mit einer 1,5-prozentigen, auf 37 °C temperierten Agarose-Medium-Lösung gefüllt. Zur Polymerisation der Agarose wurde die Lunge *in situ* mit Eis bedeckt und 20 min gekühlt. Zuletzt wurden die Lungenflügel mit dem Herz aus dem Brustkorb entfernt und bis zum Schneiden auf Eis aufbewahrt.

Herstellung von PCLS:

Die Lungenlappen wurden mit einem Skalpell voneinander getrennt, nacheinander in ein Mikrotom (*Krumdieck Tissue Slicer*) eingeführt und bei einer Oszillation von 40-50 Hz geschnitten (Abb. 7A). Der zylindrische Gewebehalter wurde über einer oszillierenden Klinge bewegt. Dadurch konnten von unten kontinuierlich neue Schnitte konstanter Schnittdicke produziert werden. Die produzierten PCLS besaßen eine Schichtdicke von $200\text{ }\mu\text{m} \pm 20\text{ }\mu\text{m}$ (Abb. 7B). Die Schnitte wurden mit einer Einmalimpföse aus der Sammelfalle, die mit eisgekühltem EBSS gefüllt war, entnommen, in Zellkulturschalen mit 10 ml DMEM übertragen und bei 5% CO₂, 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die PCLS wurden nach dem Schneiden zwei Stunden lang alle 30 min bei gleichen Bedingungen mit 10 ml DMEM gewaschen, um die Agarose zu entfernen. Dabei wurde dem Medium im letzten Waschschrift 1 % Antibiotikum (10.000 Einheiten Penicillin, 10 mg Streptomycin) zugeführt.

Im Anschluss erfolgte die Exposition der PCLS mit verschiedenen Konzentrationen der SLN und die Bestimmung toxikologischer und immunologischer Endpunkte.

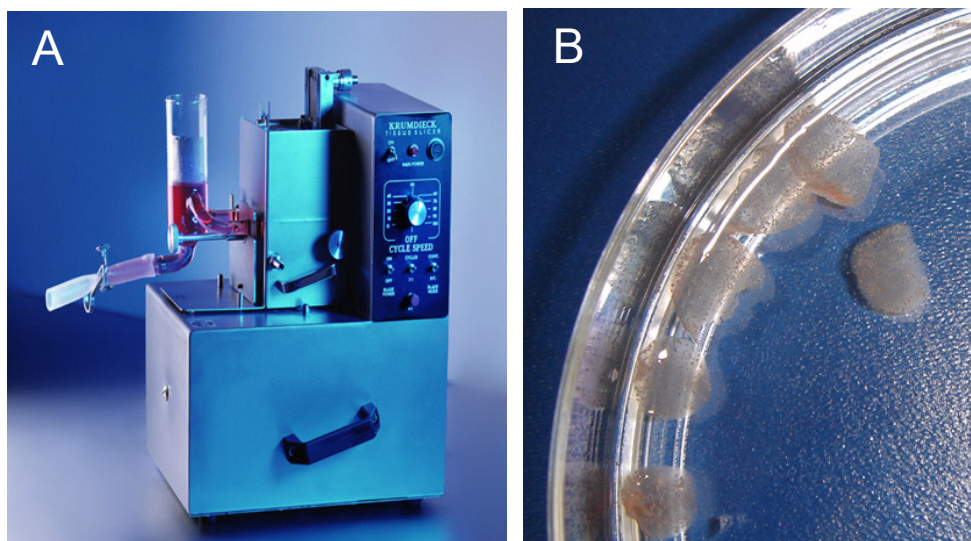


Abb. 7: A) Krumdieck Tissue Slicer zur Herstellung der PCLS, B) PCLS in Medium

3.5.2 Exposition der PCLS mit den SLN

Nanosuspensionen

Lipopolysaccharid (LPS, E. coli, Serotyp 0111:B4)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zellkulturplatten (24 Vertiefungen)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Für jeden Ansatz wurden vier murine PCLS verwendet. Die Inkubation der PCLS mit den SLN erfolgte in abgestuften Konzentrationen in einem Endvolumen von 500 µl DMEM (mit 1 % Antibiotikum). Als Negativkontrolle bzw. Gewebekontrolle wurden vier Schnitte in DMEM ohne weitere Zusätze kultiviert. Für die Positivkontrolle oder Tritonkontrolle wurden vier Gewebeschnitte durch 1 % Triton X-100 lysiert. Um die Stimulierbarkeit oder das Ansprechen der PCLS auf immunstimulierende Substanzen zu überprüfen, wurden vier weitere PCLS mit 5 ng/ml LPS inkubiert.

Nach 24 h wurden die Überstände der Doppelansätze vereinigt und mit 50 µl Proteaseinhibitor versetzt. Abschließend wurden sie zu je 120 µl aliquotiert, bei –80 °C eingefroren und so bis zur Messung der Zytokine und Chemokine aufbewahrt.

3.5.3 WST-Vitalitätstest

WST-1	Roche, Mannheim, Deutschland
DMEM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Photometer (ELISA Reader)	Dynatech, Deisendorf, Deutschland
Zellkulturplatten (24 Vertiefungen)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen)	NUNC, Wiesbaden, Deutschland

Prinzip:

Als Maß für die Vitalität wird die metabolische Aktivität der Zellen nach Inkubation mit den SLN gemessen. Das chromogene Tetrazoliumsalz (Natrium 4-[3-(4-Jodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat, WST-1) wird durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen lebender Zellen reduktiv aufgespalten, wodurch ein wasserlösliches Formazansalz entsteht (Abb. 7). Der umgesetzte Farbstoff wird photometrisch bei 420-480 nm vermessen. Die Absorption korreliert mit der Anzahl der aktiven Zellen.

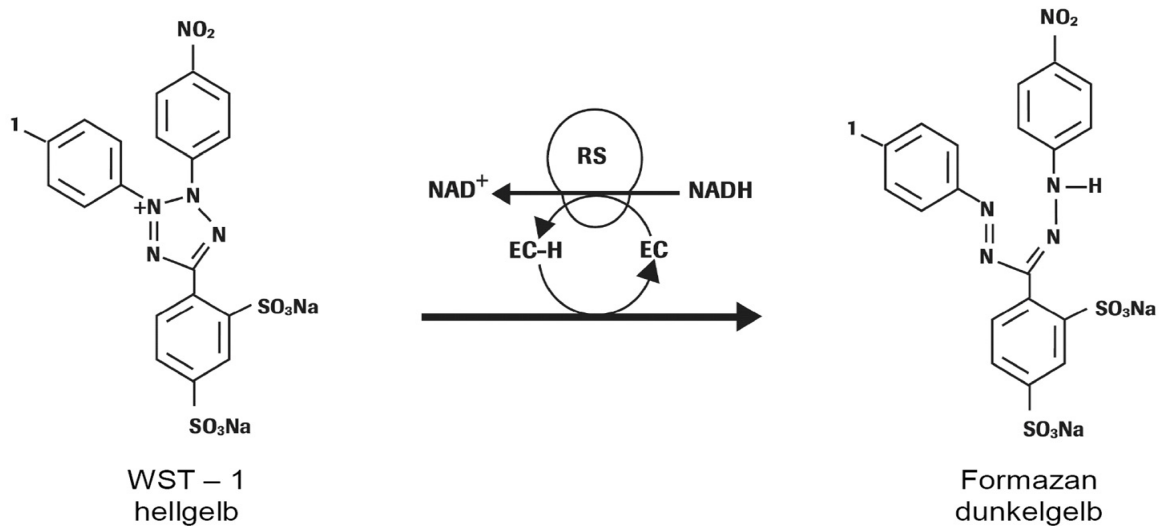


Abb. 8: Farbreaktion des WST-1-Tests

Durchführung:

Zunächst wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und weggefroren. Der WST-Test wurde in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen in Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden zwei Gewebeschnitten 250 µl WST-1-Lösung (Verdünnung 1 : 11 in Medium) zugesetzt und für 60 min im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde danach in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen überführt und die Absorption in einem Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt.

3.5.4 Lebend/Tot-Vitalitätsfärbung

Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Horizontalschüttler	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Zellkulturplatten (24 Vertiefungen)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Prinzip:

Zum Nachweis lebender und toter Zellen wurden die PCLS mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein AM) und Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1) gefärbt und mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

Das hydrophobe, nichtfluoreszierende und membranpenetrierende Calcein wird in der lebenden Zelle durch intrazelluläre Esterasen in das stark grün fluoreszierende Calcein gespalten. Dieses Polyanion vermag die intakte Zytoplasmamembran nicht zu durchdringen und wird in der Zelle akkumuliert. Das hydrophile Ethidiumhomodimer hingegen kann nur durch die geschädigte Membran toter Zellen eindringen und bindet dort an Nukleinsäuren des Zellkerns. Dabei erfährt es eine vierzigfache Verstärkung der intensiv roten Eigenfluoreszenz. Intakte Membranen lebender Zellen vermag Ethidiumhomodimer nicht zu durchdringen.

Durchführung:

Die Lungenschnitte wurden nach 24 h vom Überstand getrennt. Die Lebend/Tot-Färbung wurde in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen in Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei wurden zwei PCLS mit 250 µl Farbstofflösung (4 µM Calcein AM und 4 µM EthD-1 in DMEM) versetzt und bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler für 45 min lichtgeschützt inkubiert. Abschließend wurden die PCLS zweimal mit Medium gewaschen, bevor sie mikroskopiert wurden.

3.5.5 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Konfokales Laserscanningmikroskop

Zeiss, Jena, Deutschland

(Zeiss LSM 512 Meta)

LSM-Meta-512-Software

Zeiss, Jena, Deutschland

Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) war es möglich, optische Schnitte in räumlich ausgedehnten Objekten aufzunehmen und mit Hilfe der LSM-512-Software die Schnittbilder schichtweise zu einer dreidimensionalen Darstellung (Z-Stapel) zusammenzufügen. Die quantitative Auswertung dieser Z-Stapel war durch Verwendung einer Software zur 3D-Bildanalyse (IMARIS 4.5.2) möglich.

Das besondere an einem konfokalen Laser-Scanning-System ist, dass die Anregung und Detektion des zu untersuchenden Objekts rasterartig erfolgt – im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, bei der das gesamte Objekt angeregt und detektiert wird. Das Licht des Lasers wird auf einen Punkt in der zu untersuchenden Ebene fokussiert. Das dabei von dem Untersuchungsgegenstand emittierte Licht wird auf eine Lochblende (*pinhole*) fokussiert und von einem dahinter liegenden Detektor (meist ein Photomultiplier) registriert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Streulicht aus der oberen oder unteren Ebene der Probe unterdrückt wird, wodurch kontrastreiche und hoch aufgelöste Bilder entstehen. Da die Fokusebene in z-Richtung verschoben werden kann, können so ganze Stapel optischer Aufnahmen gemacht und zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden. Diese lassen sich leicht digital verarbeiten und auswerten.

Für die Aufnahmen wurden ein C-Apochromat 40x/1.2-Wasser-Objektiv und ein W-PI 10x/23-Okkular benutzt. Die Laser zur Anregung der Farbstoffe waren ein Helium/Neon-Laser für EthD-1 und ein Argon-Laser für Calcein. Durch die Aufnahme über zwei Kanäle wurde mit folgenden Filtern gearbeitet: HFT 488 und BR 505-550 bzw. HFT 488/543 und LP 560. Die Anregungswellenlänge für Calcein lag bei 488 nm und für EthD-1 bei 543 nm. Die Emissionswellenlänge für Calcein lag bei 500-550 nm und für EthD-1 bei 560-650 nm. Die Länge der aufgenommenen z-Koordinate (Anzahl der z-Stapel) betrug insgesamt $20\ \mu\text{m} \pm 3\ \mu\text{m}$. Der Abstand der einzelnen Aufnahmen umfasste $0,49\ \mu\text{m}$. Die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung erfolgte mittels der IMARIS-4.5.2-Software.

3.5.6 Quantitative 3D-Bildanalyse

LSM-Meta-512-Software

Zeiss, Jena, Deutschland

IMARIS-4.5.2-Software

Bitplane, Zürich, Schweiz

Die Auswertung der erstellten dreidimensionalen Bilder des Lungengewebes erfolgte durch die Software IMARIS 4.5.2. Das Programm prozessiert und visualisiert dreidimensionale mikroskopische Aufnahmen und ermöglicht so eine Quantifizierung bestimmter Strukturen, z. B. die Auswertung von Lebend/Tot-Färbungen mit Calcein und Ethidiumhomodimer von PCLS. Zunächst wurde die Oberfläche des vitalen pneumozytären Gewebes generiert, wobei gleichzeitig eine automatische Volumenbestimmung stattfand. Bei der Generierung des Gewebevolumens wurde zur Reduzierung der Hintergrundfärbung eine optimale Fluoreszenzintensität eingestellt. Dann wurde eine zweite Oberfläche eingerichtet, die auf die Ethidium-Färbung abgestimmt war. Für die Quantifizierung der roten Zellkerne wurde der zu bewertende Minimal-Kerndurchmesser auf 5 μm festgesetzt.

Zur einheitlichen Beurteilung aller Gewebeaufnahmen wurden die Parameter universell festgesetzt, was eine objektive Auswertung gewährleistete.

3.6 *In-vivo*-Untersuchungen

3.6.1 Haltung der Versuchstiere

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz in der Fassung vom 25.05.98 und mit der Änderung vom 12.04.01 durchgeführt. Tierversuchsgenehmigungen lagen unter der Nummer 07/1303 vor. Die Versuchstiere wurden im Tierhaus des Fraunhofer ITEM unter standardisierten und täglich kontrollierten Bedingungen gehalten (Temperatur: 20-22 °C, Luftdruck: 10 hPa, Luftfeuchtigkeit: 40-70 %, Beleuchtung: 12-h-Tag/Nacht-Rhythmus). Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.6.2 Aerosolgenerierung und Exposition

BALB/cAnNCrl-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Perfusor	B. Braun, Melsungen, Deutschland
50 ml Perfusor Spritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Perfusor-Leitung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Marple-Kaskadenimpaktor (9 Stufen)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
2-Stoff-Düse (Eigenbau)	Fraunhofer ITEM, Hannover, Deutschland
Expositions-kammer (Eigenbau)	Fraunhofer ITEM, Hannover, Deutschland
Dreihalskolben	Schott, Mainz, Deutschland
Waschflaschenaufsatz mit Filterplatte	Schott, Mainz, Deutschland
Durchflussmessgerät	Westphal, Ottobrunn, Deutschland
Diverse Schläuche und Verbindungen	Landefeld, Kassel, Deutschland

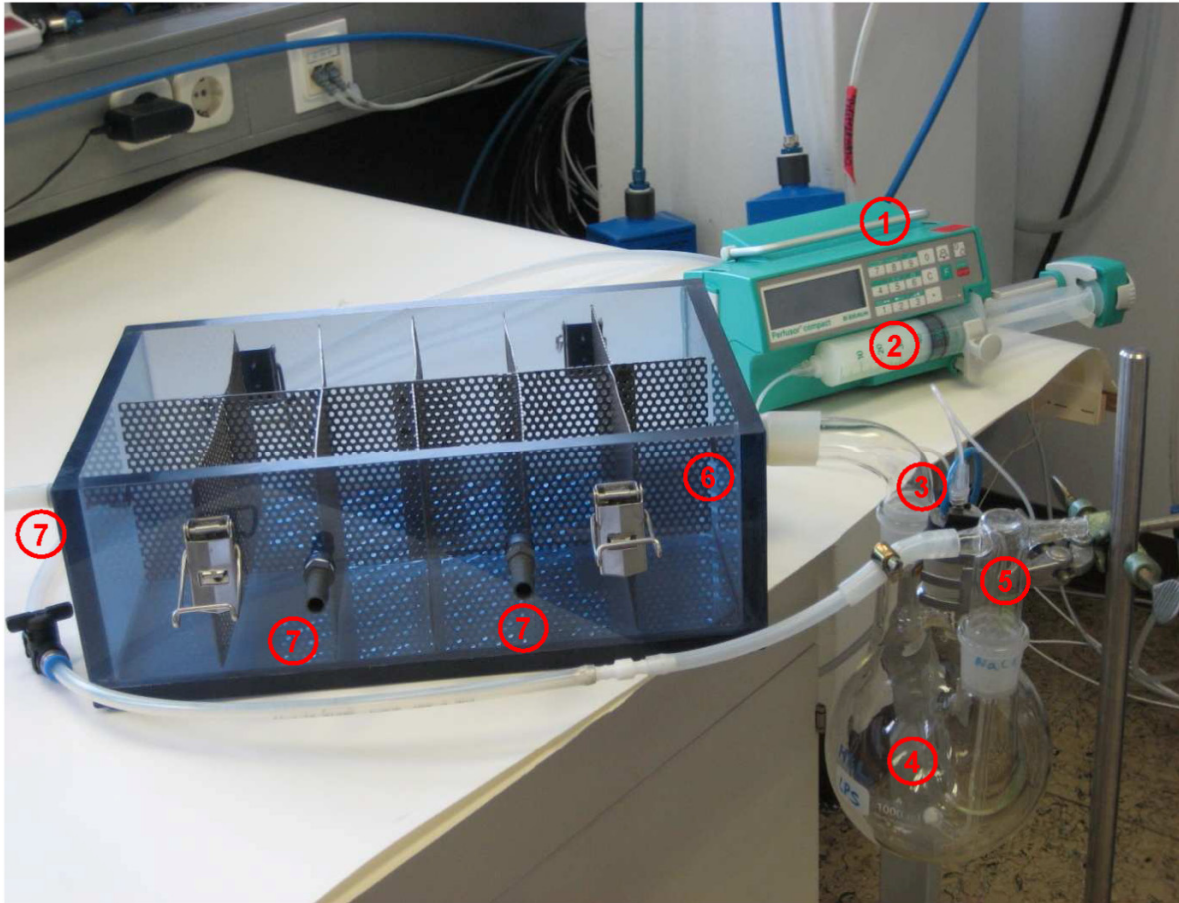


Abb. 9: Aerosolgenerierungsanlage

Tabelle 2: Bauteile und Funktion der Aerosolgenerierungsanlage

Nummer	Bauteil	Funktion
1	Perfusor	Steuerung der Dosierrate
2	Perfusor-Spritze	SLN-Reservoir
3	2-Stoff-Düse	Vereinigung der Druckluft- und SLN-Zufuhr → Aerosolgenerierung
4	Drehhalskolben	Trocknung des Aerosols
5	Waschflaschenaufsatz	zusätzliche Luftzufuhr für die Trocknung des Aerosols
6	Expositionskammer	Exposition der Tiere
7	Anschlüsse	Anschlüsse für Impaktormessung und Photometer

3.6.2.1 Aerosolgenerierung:

Die SLN-Aerosole wurden über eine 2-Stoff-Mikrozerstäuberdüse generiert. Dazu wurden die Nanosuspensionen über eine Perfusor-Leitung von der Perfusor-Spritze in die Zerstäuber-Düse überführt. Über einen zweiten Anschluss an der Düse wurde Druckluft (30 l/min) in die Zerstäuberdüse gepresst, wodurch die Nanosuspensionen zerstäubt wurden. Der Perfusor diente zur Einstellung der Dosierate und sorgte während der Vernebelung in unseren Experimenten für eine Dosierung von 50 ml/h. Die Mikrodüse erzeugte, entsprechend den Einstellungen der Spaltgröße, Aerosolpartikel mit verschiedenen aerodynamischen Massen-mediandurchmessern (MMAD).

Nach der Zerstäubung der Nanosuspension gelangte das Aerosol in den Bauch eines Dreihalskolbens, wo die Aerosoltröpfchen getrocknet wurden. Um die Trocknung zu beschleunigen wurde zusätzlich über einen Waschflaschenaufsatz mit Filterplatte Luft mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 l/min in den Kolben geblasen.

Durch Anlegen eines Vakuums mit einem Durchfluss von 40 l/min am Ende der Expositions-kammer wurden die Aerosolpartikel aus dem Dreihalskolben gesaugt und in die Expositions-kammer befördert (Abb. 9).

3.6.2.2 Aerosolcharakterisierung:

Um eine gleich bleibende Aerosolqualität während der 16-tägigen Inhalationsstudie zu gewährleisten, wurde täglich vor der Vernebelung der Nanosuspensionen eine Impaktormessung durchgeführt (Abb. 10). Dabei wurden u. a. zwei wichtige Charakteristika ermittelt: der MMAD (aerodynamischer Massenmediandurchmesser) und die GSD (geometrische Standardabweichung). Der MMAD bezieht sich auf das Verhalten der Teilchen in einer Luftströmung und ist damit für Belange der Inhalationstherapie ein sehr aussagekräftiger Wert. Aerosole setzen sich in aller Regel aus Tröpfchen bzw. Aerosolpartikeln mit unterschiedlichen Durchmessern zusammen. Ein Maß für die Streuung der Partikelgrößen ist die Standardabweichung vom MMAD. Je größer die GSD, umso größer die Streuung. Aerosole mit einer GSD bis 1,25 nennt man monodispers, mit größerer GSD polydispers. Die meisten kommerziellen Vernebler liefern Aerosole mit einer GSD von ca. 2. Für den MMAD in der vorliegenden Arbeit wurden durchschnittlich Werte von $2,26 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ermittelt. Dies zeigt, dass die generierten Aerosolpartikel von ihrer Größe her in der Lage sind, die Alveolarregion zu erreichen.

Durch die Bestimmung der GSD, wobei Werte von $1,33 \pm 0,12$ ermittelt wurden, konnte gezeigt werden, dass die generierten Aerosolpartikel eine annähernd monodisperse Größenverteilung aufwiesen.

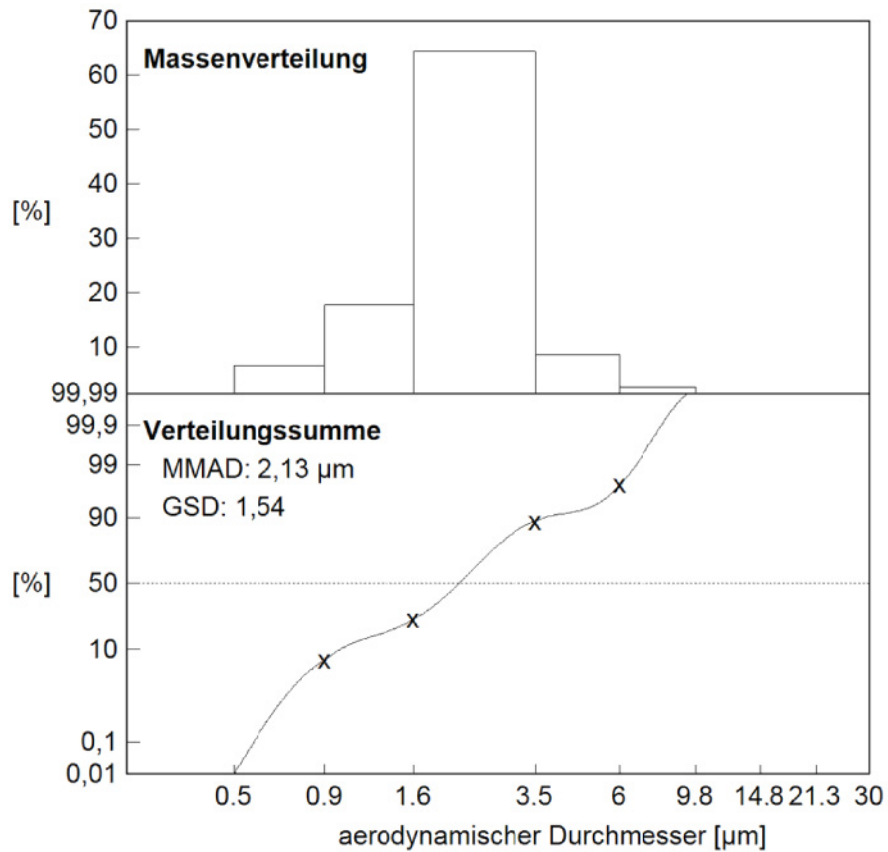


Abb. 10: Repräsentative grafische Auswertung einer Impaktormessung

3.6.2.3 Studiendesign der inhalativen Toxizitätsstudie

Für die Ermittlung der akuten Toxizität wurde die Versuchstiere täglich 16 Tage lang inhalativ entweder mit den SLN, Vehikellösung, Reinluft oder Carbon Black behandelt (Abb. 11). Die Lipidnanosuspensionen wurden in sechs unterschiedlichen Dosierungen eingesetzt. Um toxische Effekte der stabilisierenden Emulgatorlösung auszuschließen, wurde diese Vehikellösung gleicher Konzentration (3 %) ebenfalls an die Tiere vernebelt und als Negativkontrolle bezeichnet. Für die Behandlung der Tiere mussten diese täglich zwischen den Räumlichkeiten des Tierhauses und dem Expositionsraum hin und her transportiert werden, was sich in Form von Stress auf die Tiere auswirkt. Um diese Stresseffekte zu ermitteln bzw. auszuschließen, wurden 6 Tiere 16 Tage lang scheinbehandelt. Sie wurden ebenfalls zwischen den Räumlichkeiten hin und her transportiert und in die Expositions-kammern gesetzt. Behandelt wurden sie allerdings nur mit Reinluft. Als Positiv- oder Nanopartikelkontrolle wurde Carbon Black benutzt. Es wurde in vielen Studien gezeigt, dass Carbon Black Entzündungen in der Lunge verursachen kann [171, 172].

Um die Entwicklung des toxischen Potenzials charakterisieren zu können, wurden die Versuchstiere an vier verschiedenen Zeitpunkten aufgearbeitet. Die Sektion/finale Untersuchung fand jeweils 24 Stunden nach der letzten Behandlung statt.

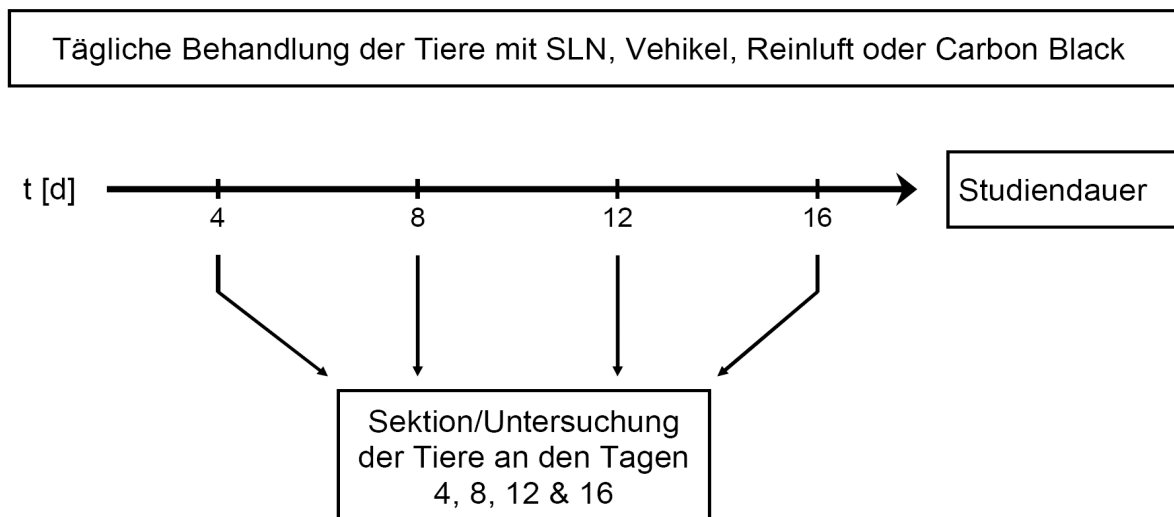


Abb. 11: Schematische Darstellung des Studiendesigns der 16-Tages-Inhalationstoxizitätsstudie

3.6.2.4 Gruppeneinteilung und Behandlung der Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 198 weibliche BALB/cAnNCrI-Mäuse. Zum Zeitpunkt der Lieferung waren sie 8-10 Wochen alt und wogen durchschnittlich 18,5 g. Die Tiere wurden von Charles River bezogen. Allen Tieren wurde eine Eingewöhnungsphase von mindestens 7 Tagen gewährt, bevor mit den Versuchen begonnen wurde.

Jede Gruppe umfasste eine Stärke von $n = 24$ Tieren, die in Gruppen zu je 6 Tieren an vier unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe Abb. 11) aufgearbeitet wurden. Um die Tieranzahl zu reduzieren, wurden für die Reinluftkontrolle nur 6 Tiere mitgeführt, die zum letzten Analysenzeitpunkt aufgearbeitet wurden.

Die inhalative Applikation der Nanosuspensionen erfolgte in sechs verschiedenen Konzentrationen, die den Bereich von 1-200 μg deponierter Dosis abdeckten. In der Negativkontrolle wurden 200 μg Vehikellösung vernebelt. Die Carbon-Black-Dosierung betrug 150 μg . Diese Dosierung wurde in einer Vorstudie ausgetitriert. Die Tiere der Reinluftkontrolle wurden eine Stunde mit Reinluft behandelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die Gruppeneinteilung und Behandlung in der Inhalationsstudie

Behandlungsgruppe	Behandlung	deponierte Dosis	n/Gruppe/Sektion	n/Gruppe
Lipidnanopartikel	SLN30	1 μg	6	24
Lipidnanopartikel	SLN30	10 μg	6	24
Lipidnanopartikel	SLN30	35 μg	6	24
Lipidnanopartikel	SLN30	100 μg	6	24
Lipidnanopartikel	SLN30	150 μg	6	24
Lipidnanopartikel	SLN30	200 μg	6	24
Negativkontrolle	Vehikel	200 μg	6	24
Positivkontrolle	Carbon Black	150 μg	6	24
Reinluftkontrolle	Reinluft			6
Gesamtanzahl				198

3.6.2.5 Exposition

Für die Exposition wurden die Tiere einzeln in die Expositions-kammer an durch Gitter getrennte Plätze gesetzt. Die Expositions-kammer bot Platz für 12 Tiere pro Expositionsdurchgang (siehe Abb. 9). An jedem Versuchstag wurde das Aerosol durch Impaktormessungen und Filterproben charakterisiert. Die Aerosolkonzentration wurde kontinuierlich während der Exposition über ein gravimetrisch kalibriertes Photometer überwacht. Basierend auf der Erfahrung in präklinischer Atemwegsforschung in unserer Arbeitsgruppe [173, 174] und auf Literaturwerten zur Depositionswahrscheinlichkeit von Aerosolpartikeln bestimmter Größe [122, 175-177] wurde die deponierte Dosis über die Atemfrequenz, das Atemminutenvolumen und das Atemzugvolumen der Tiere ermittelt. Die unterschiedlichen deponierten Dosen wurden über die Expositionsdauer definiert.

3.6.3 Sektion/Aufarbeitung

BALB/cAnNCrI-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
PBS	Lonza, Visp, Schweiz
OCT	Sakura, Aachen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 70 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital-Natrium (Narcoren)	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Zellzählgerät CASY TT	Innovatis, Reutlingen, Deutschland
Spritze 1 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
1,5 ml PP-Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5 ml PP-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
50 ml PP-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Venenverweilkatheter Abbocath-T G20	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)	Hammacher, Solingen, Deutschland
Steriles chirurgisches Nahtmaterial	F. Ernst, Hannover, Deutschland
Eisbad	
Flüssiger Stickstoff	

24 h nach der Exposition wurden die Tiere durch Verabreichung einer Überdosis Pentobarbital-Na (1/5 verdünnt mit PBS, 250 µl pro Maus) für die anschließende Probenentnahme eingeschläfert. Sofort nach Eintritt des Todes wurde das Abdomen eröffnet, die *Vena Cava* freigelegt und aus dieser 0,3 bis 0,4 ml Blut mit einer Spritze entnommen. Das gewonnene Blut wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde verworfen. Anschließend wurde die Trachea freigelegt. Im Bereich unterhalb des Kehlkopfs wurde ein Venenverweilkatheter eingeführt, über den die Lunge zweimal mit 0,8 ml eisgekühltem PBS lavagiert wurde. Die gewonnene bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) wurde in ein 5 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 250 µl aliquotiert und bei -80 °C bis zur Bestimmung der Zytokine und Chemokine gelagert. 100 µl des Überstandes wurden für die anschließende Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und der Laktatdehydrogenase-Aktivität benutzt.

Für die Ermittlung der Zellzahl wurden die zellulären Rückstände in 500 µl PBS resuspendiert und am Casy Cell Counter gezählt. Bis zur Anfertigung der Zytospots wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Der rechte Lungenflügel wurde mit einer Klemme am Bronchus abgeklemmt. Der linke Lungenflügel wurde über den Venenverweilkatheter mit *optimal cutting temperature compound* (OCT, 1 : 3 mit PBS verdünnt) befüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Der rechte Lungenflügel wurde mit 4-prozentiger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung befüllt und in 4-prozentiger PFA-Lösung in einem 50 ml Röhrchen bei Raumtemperatur gelagert. Abschließend wurden für die pathologische Begutachtung noch die Leber, die Milz und die Nieren der Tiere entnommen und in das mit 4-prozentiger PFA-Lösung gefüllte 50 ml Röhrchen überführt.

3.6.4 Mikroskopische Zelldifferenzierung nach Pappenheim

Giemsa-Färbelösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
May-Grünwald-Färbelösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Lonza, Visp, Schweiz
Mikroskop: Axio Vision	Zeiss, Jena, Deutschland
Zytofuge	Shandon, Frankfurt a. M., Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland

Prinzip:

Bestimmte Zellkompartimente unterscheiden sich durch ihren Gehalt an sauren oder basischen Molekülen. Saure Bestandteile der Zelle mit negativer elektrischer Ladung wie die DNA in den Nuclei oder die RNA der Nucleoli und des Zytoplasmas sind basophil und lassen sich mit basophilen Farbstoffen wie Giemsa in wässriger Lösung bläulich färben. Viele zytoplasmatische Proteine sind dagegen azidophil und färben sich mit sauren Farbstoffen wie May-Grünwald rot. Zytoplasma und Kernverhältnisse sowie charakteristische Granula der Zellen sind auf diese Weise mikroskopisch erkennbar und erlauben eine morphologische Differenzierung (siehe Abb. 12).

Durchführung:

$1 \cdot 10^5$ Zellen aus der BALF wurden in 250 μ l PBS durch Zentrifugation in einer Zytocentrifuge für 5 min bei 500 rpm auf einen Objektträger gebracht und luftgetrocknet. Die getrockneten Zytospots wurden 5 min lang in May-Grünwald-Lösung gefärbt und anschließend für 2 min in PBS gespült. Danach wurde für 20 min mit Giemsa-Lösung 1 : 20 gefärbt und anschließend mit PBS gewaschen. 500 gefärbte Zellen wurden lichtmikroskopisch gezählt und morphologisch in Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile und Lymphozyten differenziert.

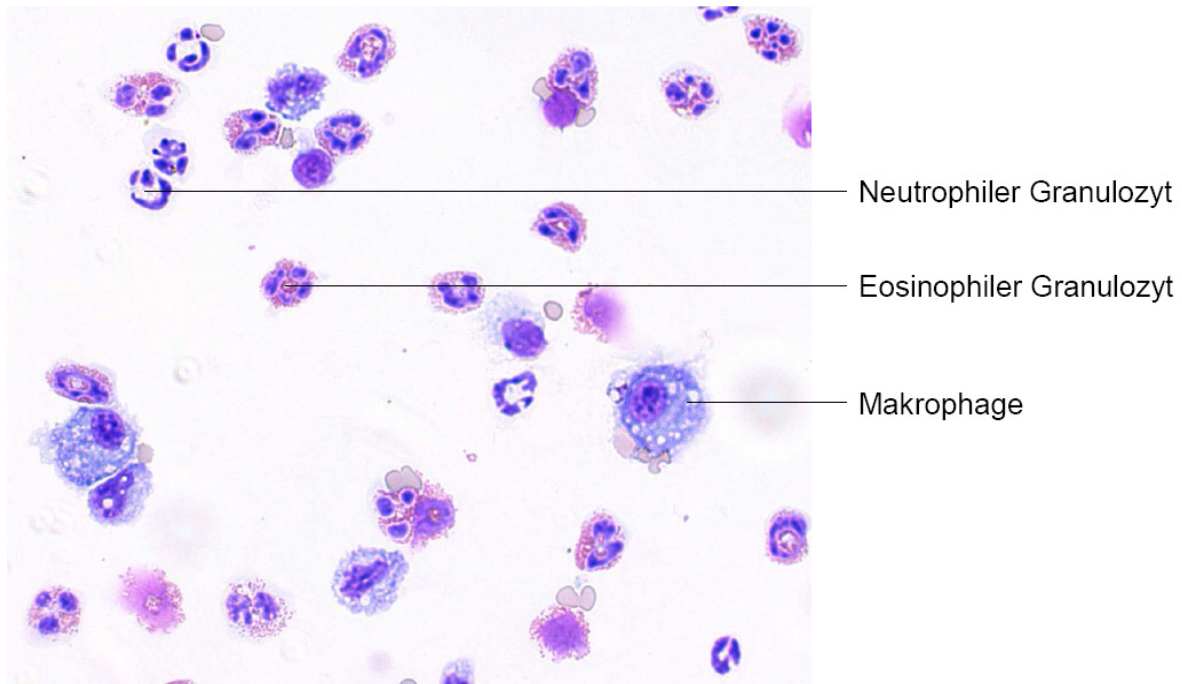


Abb. 12: Beispiel eines nach Pappenheim gefärbten Zytospots von BAL-Zellen

3.6.5 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität

Cobas-Fara Zentrifugalanalysator

Roche, Mannheim, Deutschland

Die biochemische Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in der BALF erfolgte kolorimetrisch bei 750 nm mit dem speziell für klinische Zwecke entwickelten Zentrifugalanalysator nach der Methode von Lowry *et al.* [178].

LDH katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat. Damit einhergehend wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die Änderungsgeschwindigkeit der Extinktionsdifferenz zwischen 340 nm und 405 nm hängt mit der Umwandlung von NADH zu NAD⁺ zusammen und ist direkt proportional zu der katalytischen Menge des im Überstand befindlichen Enzyms.

Die LDH-Aktivität in der frisch gewonnenen BALF wurde kolorimetrisch mit dem Zentrifugalanalysator bei 340 nm ermittelt.

3.6.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Blockpuffer

Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serum-Albumin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Sucrose	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Lonza, Visp, Schweiz

Waschpuffer

PBS-Tween Tabletten	Medicago, Uppsala, Schweden
---------------------	-----------------------------

Aqua bidest.

2 N H ₂ SO ₄	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TMB One (Enzymsubstrat)	Kem-En-Tec, Taastrup, Dänemark
Mikrotiterplatten Maxisorp (96 Vertiefungen)	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Photometer (ELISA Reader)	Dynatech, Deisenhofen, Deutschland
Pipetten	Labsystem, Vantaa, Finnland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
hIL-8, KC, mTNF- α , mL-6 Duoset	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

Prinzip:

ELISA nutzt die Bindungsspezifität von Antikörpern zum quantitativen Nachweis eines Antigens in einer Probe. Dabei wird ein antigenspezifischer Primärantikörper im Überschuss unspezifisch an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Das in der Probe enthaltene Antigen wird spezifisch vom Primärantikörper gebunden und kann mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper, dem sogenannten Detektionsantikörper, markiert werden. Die Antikörperbindung wird beim ELISA mit Hilfe einer Farbreaktion nachgewiesen. Hierbei wird dem Ansatz eine Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) zugesetzt. Anschließend bindet Streptavidin an das Biotin der Präzipitate und die Zugabe des Enzymsubstrats Tetramethylbenzidin (TMB) und H₂O₂ bewirkt einen Farbwechsel. Durch Zugabe von H₂SO₄ wird die enzymatische Substratumsetzung gestoppt und ein Farbumschlag von blau zu gelb hervorgerufen. Die Umsetzung des Farbsubstrates erfolgt quantitativ und kann photometrisch über die Änderung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm bestimmt werden. Ein quantitativer

Nachweis des Antigens in der Probe kann durch Abgleich mit einer Standardreihe erbracht werden.

Durchführung:

Die Durchführung für die Bestimmung von hIL-8, Chemokin KC, mIL-6 und mTNF- α erfolgte exakt nach dem von der Firma gelieferten Protokoll. Die Nachweisgrenze war der unterste Standardwert. Die Quantifizierungsgrenze war der unterste Standardwert, der bei einer Doppelbestimmung einen Variationskoeffizient unter 0,2 aufwies und dessen Wert mindestens fünfmal höher als der Leerwert war.

3.6.7 Histopathologische Begutachtung ausgewählter Organe

Hämatoxylin/Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formalin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraffin (Histoplast)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Gewebeeinbettungsautomat (Shandon Hypercenter)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Ausgießstation (Thermo Shandon)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Rotationsmikrotom	Microm, Walldorf, Deutschland
Färbeautomat (Shandon Varistain)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Für die histopathologische Beurteilung der Lunge, Leber, Nieren und Milz der Behandlungsgruppen wurden die Organe nach der Entnahme in 10 % gepuffertem Formalin eingelagert und fixiert. Die Organe wurden nach der Methode von Kittel *et al.* zugeschnitten [179], in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol gereinigt und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden von den eingebetteten Geweben 3- μ m-dünne Schnitte

hergestellt, welche auf einen Objektträger überführt wurden. Die Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entwacht und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt (H&E-Färbung). Mit diesem Farbstoffgemisch können azidophile Strukturen wie z. B. Zellplasmae und basophile Strukturen wie z.B. Nukleinsäuren kenntlich gemacht werden, wodurch die Gewebestrukturen differenziert werden können.

Nach der Färbung wurden die Schnitte lichtmikroskopisch begutachtet. Die histopathologischen Diagnosen erfolgten nach den von Maronpot und Kollegen sowie nach den von Renne und Kollegen beschriebenen Kriterien [180, 181]. Wenn anwendbar, wurde der Schweregrad der Läsionen wie folgt eingeteilt: 1 (gering), 2 (mild), 3 (moderat) oder 4 (merklich).

3.6.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism®, Version 4.03, durchgeführt.

Zum Vergleich von 2 Gruppen wurde der zweiseitige ungepaarte t-Test verwendet. Dabei wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant (*), $p \leq 0,001$ als hochsignifikant (**) und ab einem p-Wert von $\leq 0,0001$ als höchstsignifikant (***) befunden. Für den Vergleich von einzelnen Gruppen zu verschiedenen Analysezeitpunkten wurde die *one-way analysis of variace* (ANOVA) mit *Bonferoni post test* verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Evaluierung des zytotoxischen und inflammatorischen Potenzials der SLN

Damit die Lipidnanopartikel als Arzneistoffträgersystem für die pulmonale Applikation eingesetzt werden können, muss ihr toxisches und inflammatorisches Potenzial bekannt sein. Um diese beiden Parameter näher zu untersuchen, wurde ein Versuchsaufbau mit drei verschiedenen Testsystemen entwickelt. Als erstes wurden *In-vitro*-Studien an einer Zelllinie durchgeführt, um die Effekte der SLN zu sichten. Zur Erhöhung der klinischen Bedeutsamkeit wurde als nächstes ein *Ex-vivo*-Testsystem mit Präzisionslungenschnitten (PCLS) eingesetzt. Durch diese vorangehenden Studien sollten definierte Rahmenbedingungen für *In-vivo*-Versuche geschaffen werden, sodass als drittes Testsystem ein Tiermodell verwendet werden konnte. In einer nach OECD-Richtlinien durchgeführten Tierstudie wurden die Nanosuspensionen als Aerosol an Mäusen appliziert.

4.1.1 *In-vitro*-Untersuchungen

4.1.1.1 Bestimmung des zytotoxischen Potenzials

Zur Feststellung des zytotoxischen Potenzials der SLN30 auf humane alveoläre Epithelzellen wurden A549-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (0-15.000 µg/ml) der Nanosuspension für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Vitalitätsverlust der Zellen mit Hilfe des MTT-Tests und des Neutralrot-Tests (NR-Test) ermittelt. Es zeigte sich dabei, dass die SLN30 die Vitalität der A549-Zellen konzentrationsabhängig reduzieren. Die beiden unabhängigen Vitalitätsbestimmungen folgten dabei einer Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abb. 13). Zur besseren Vergleichbarkeit beider Testsysteme wurde die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) bestimmt. Dabei wurde für den MTT-Test eine EC₅₀ von 3162 µg/ml und für den NR-Test eine EC₅₀ von 2089 µg/ml ermittelt.

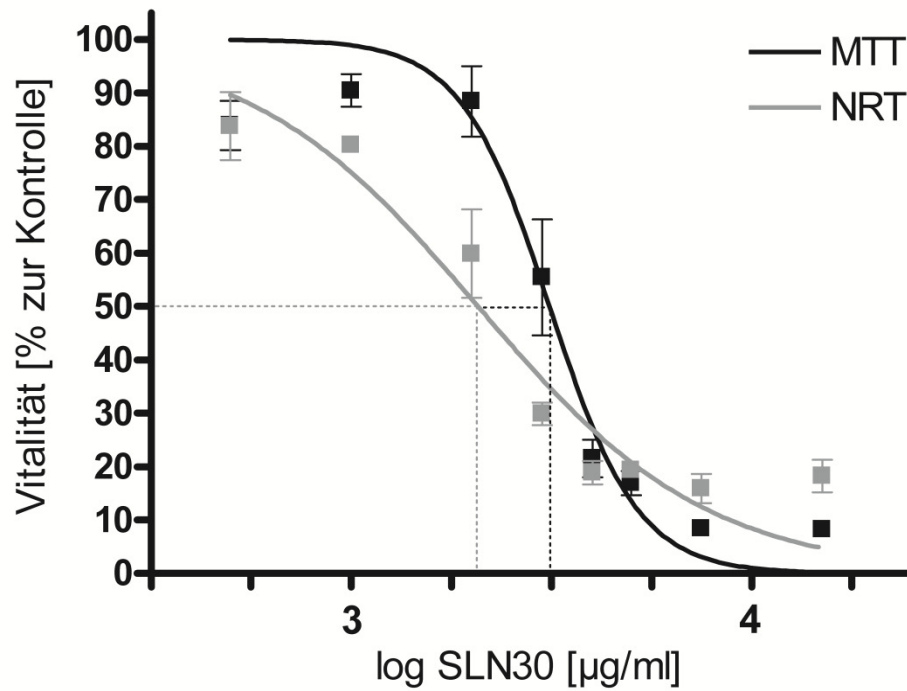


Abb. 13: Vitalität humaner alveolärer Epithelzellen (A549) nach Inkubation mit Nanosuspensionen
Die EC₅₀ beträgt 3162 µg/ml bei dem MTT-Test und 2089 µg/ml bei dem NR-Test. n = 5, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

4.1.1.2 Bestimmung des inflammatorischen Potenzials

Um ein mögliches inflammatorisches Potenzial der SLN30 zu erkennen, wurde Interleukin (IL)-8 im Zellkulturüberstand gemessen. Es ist bekannt, dass dieses proinflammatorische Zytokin hauptsächlich von Epithelzellen ausgeschüttet wird [182]. Eine 24-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von SLN30 zeigte allerdings keine Induktion von IL-8 (Abb. 14). Die Messwerte befanden sich alle in der Größenordnung der Gewebekontrolle ($202,4 \pm 46,44$ pg/ml). Zum Beispiel betrug die IL-8-Ausschüttung $207,5 \pm 87,21$ pg/ml für die SLN30-Konzentration von 7,5 mg/ml.

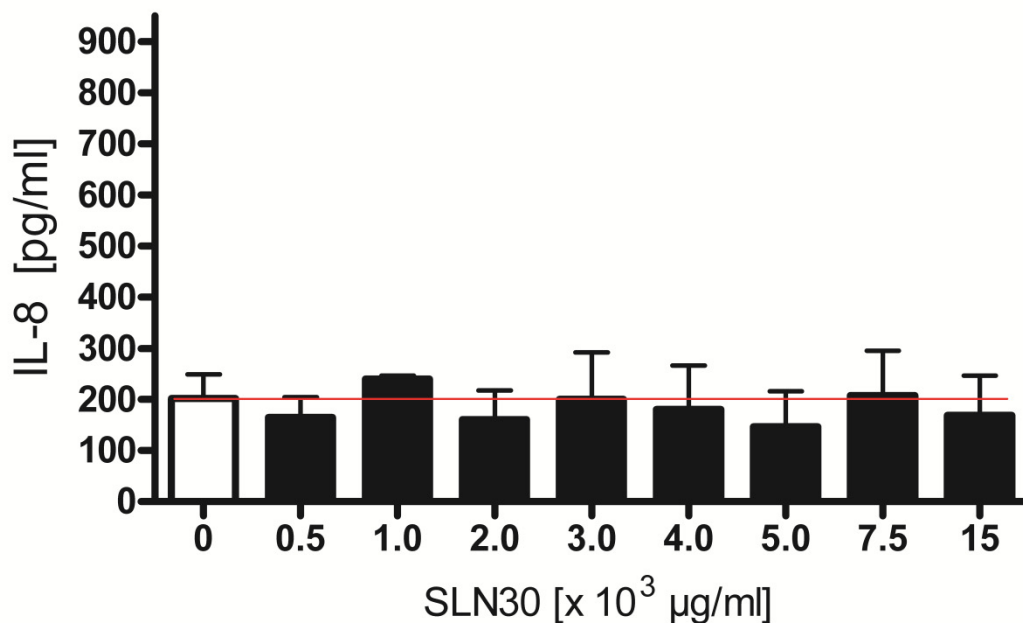


Abb. 14: Interleukin-8-Ausschüttung von A549 Zellen nach Inkubation mit SLN30

Die rote Linie zeigt den Spiegel der IL-8-Ausschüttung von der Gewebekontrolle. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

4.1.2 *Ex-vivo*-Untersuchungen

4.1.2.1 Bestimmung des zytotoxischen Potenzials

Zur Ermittlung des zytotoxischen Potenzials der SLN30 in organotypischen murinen Gewebekulturen wurden PCLS mit ansteigenden Konzentrationen von Nanosuspensionen für 24 h exponiert. Der Vitalitätsverlust wurde in diesem Fall mit dem WST-1-Test bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Nanosuspensionen die Vitalität der Gewebekulturen konzentrationsabhängig reduzieren (Abb. 15). Um die Ergebnisse besser mit den *In-vitro*-Daten vergleichen zu können, wurde die EC_{50} ermittelt. Sie betrug in diesem Fall 586 $\mu\text{g/ml}$.

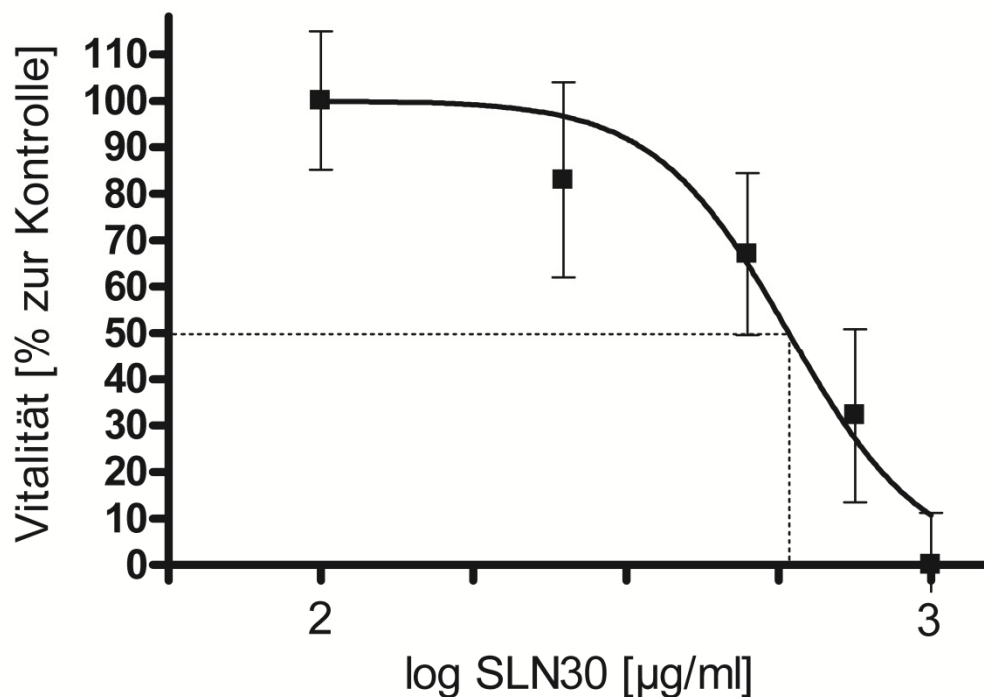


Abb. 15: Vitalität der PCLS nach 24 h Inkubation mit ansteigenden SLN30 Konzentrationen

Die EC_{50} betrug 586 $\mu\text{g/ml}$. $n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Um die Ergebnisse des WST-Tests zu verifizieren, wurde ein zweiter unabhängiger Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit den PCLS durchgeführt, bei der das Zytoplasma von lebenden Zellen gelb und die Zellkerne von toten Zellen rot dargestellt werden. Durch diese Fluoreszenzfärbung mit Calcein AM/EthD-1 konnte die Gewebestruktur der Präzisionslungenschnitte gut visualisiert werden. Die netzförmige Anordnung der Alveolen wie auch die sehr feinen alveolären Wände sind deutlich erkennbar. Die mikroskopische Untersuchung der Calcein AM/EthD-1-Färbung zeigte lebende, gelb fluoreszierende Gewebe der alveolären Struktur bis zu einer SLN30-Konzentration von

500 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 16 A-C). Die quantitative Analyse dieser fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels der IMARIS-Software verdeutlichte, dass das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen von ca. 36 Zellkernen/ $10^5 \mu\text{m}^3$ Zellvolumen zwischen 0 und 500 $\mu\text{g/ml}$ SLN30 konstant blieb (Abb. 17). Eine Kultivierung der PCLS mit höheren Konzentrationen an SLN30-Nanosuspensionen als 500 $\mu\text{g/ml}$ war charakterisiert durch eine Zunahme EthD-1-markierter Zellkerne und die Auflösung der alveolären Gewebestruktur (Abb. 16 D, E; Abb. 17).

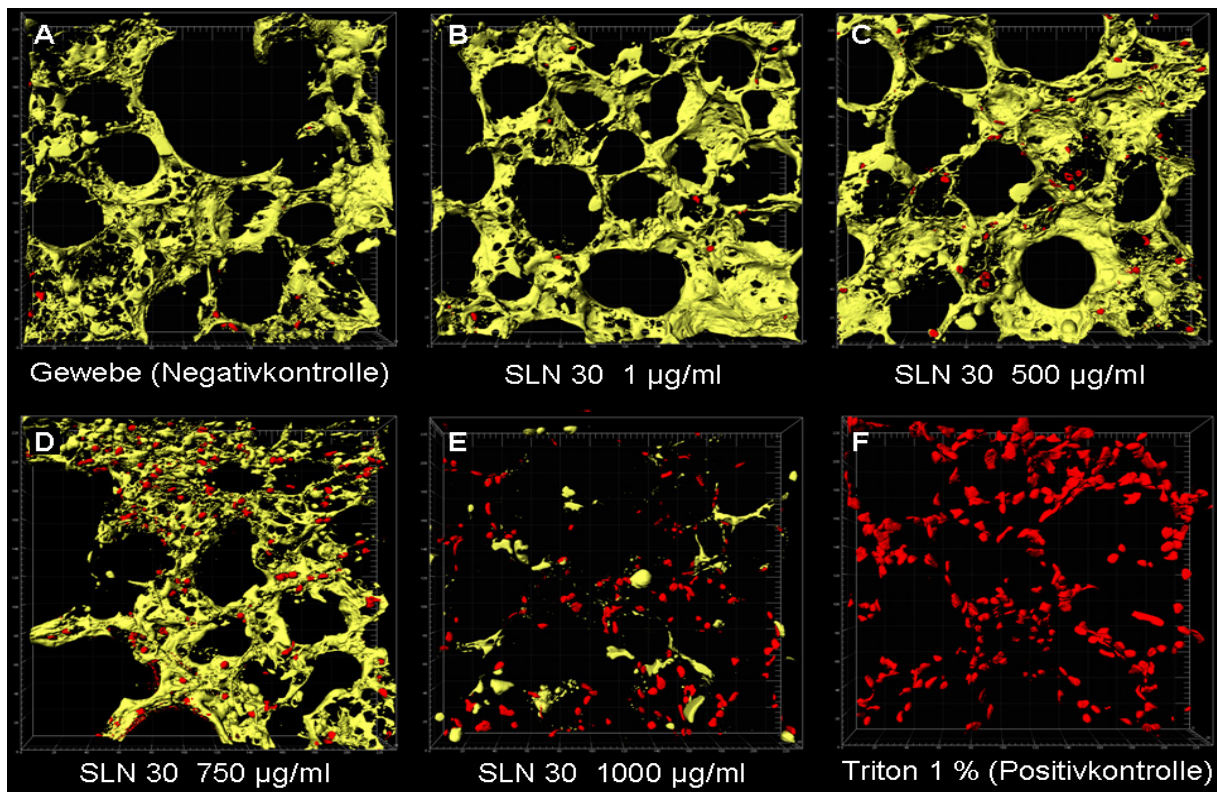


Abb. 16: Repräsentative 3D-Bilder von PCLS nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von SLN30

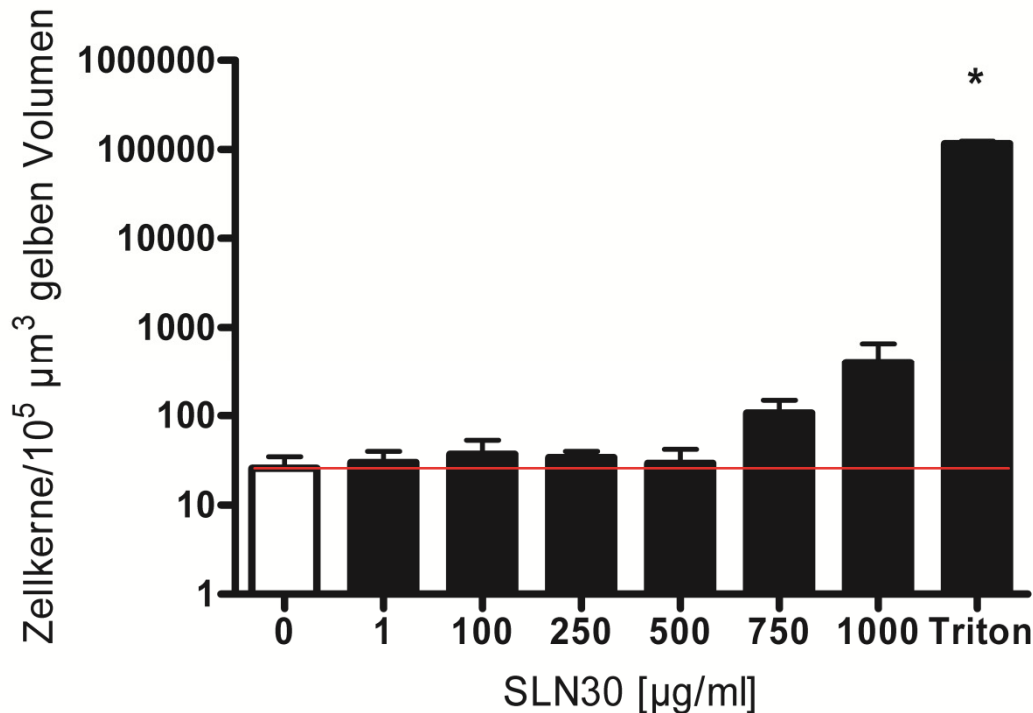


Abb. 17: Quantitative Analyse der Calcein AM/EthD-1-Färbung in PCLS; * $p < 0,05$ gegen die Gewebekontrolle (0 μg/ml SLN30), $n = 5$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

4.1.2.2 Bestimmung des inflammatorischen Potenzials

Um mögliche proinflammatorische Effekte, welche durch die SLN30-Nanosuspension induziert werden könnten, zu erfassen, wurden in den Gewebekulturüberständen die proinflammatorischen Zytokine KC (*keratinocyte-derived chemokine*, murines IL-8-Homologon) und TNF-α gemessen.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die KC-Sekretion konzentrationsabhängig beeinflusst wird (Abb. 18). Mit steigenden SLN30-Konzentrationen konnte ein signifikanter Anstieg der Chemokin-KC-Ausschüttung beobachtet werden. Der Anstieg erreichte ein Maximum bei einer SLN30-Konzentration von 500 μg/ml. Eine Inkubation der PCLS mit höheren SLN30-Konzentrationen führte zum Absinken des Chemokin-KC-Spiegels. Im Unterschied zum KC-Level konnte bei der Messung des TNF-α-Spiegels keine signifikante Erhöhung gemessen werden (Abb. 19). Lediglich bei einer SLN30-Konzentration von 100 μg/ml konnte eine leichte Erhöhung der TNF-α-Sekretion bestimmt werden. Um zu überprüfen, ob in PCLS überhaupt eine proinflammatorische Immunantwort ausgelöst werden kann, wurde in diesem Versuchsaufbau LPS als Positivkontrolle benutzt. Die Inkubation der

Präzisionslungenschnitte mit 5 ng/ml LPS zeigte einen signifikanten Anstieg der TNF- α -Sekretion.

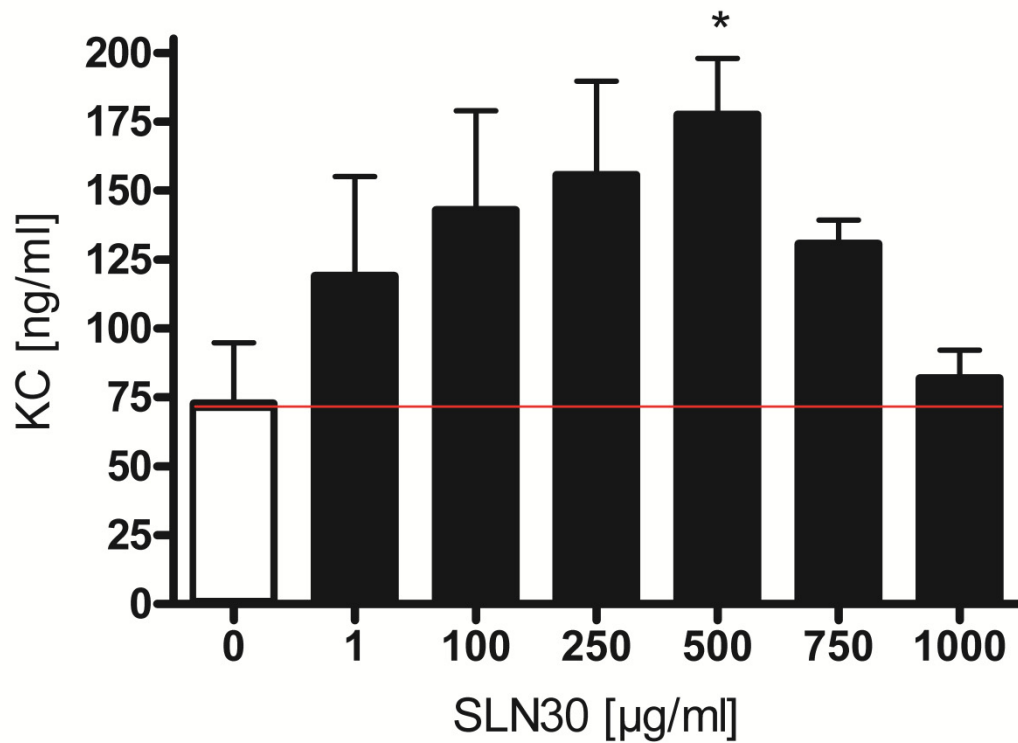


Abb. 18: Konzentrationsabhängige Chemokin-KC-Sekretion von PCLS nach Exposition mit ansteigenden Konzentrationen von SLN30. Die rote Linie markiert den KC-Basalspiegel der Gewebekontrolle. * $p < 0,05$ gegen unbehandelte Gewebekontrolle, $n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

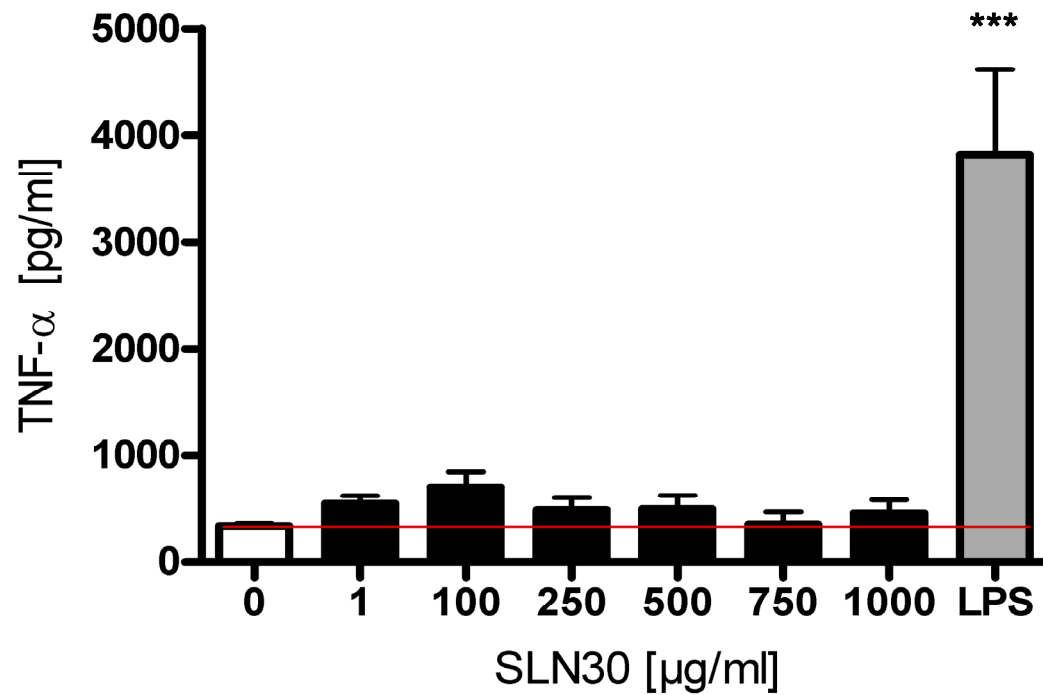


Abb. 19: Konzentrationsabhängige TNF- α -Sekretion in PCLS nach Exposition mit ansteigenden Konzentrationen von SLN30 bzw. nach Exposition mit 5 ng/ml LPS

Die rote Linie markiert den TNF- α -Basalspiegel der Gewebekontrolle. *** $p < 0,0001$ gegen unbehandelte Gewebekontrolle, $n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

4.1.3 *In-vivo*-Untersuchungen

4.1.3.1 Bestimmung des zytotoxischen Potenzials

Zur Bestimmung potenzieller zytotoxischer und inflammatorischer Wirkungen der inhalierten SLN auf das Lungengewebe wurde eine BAL durchgeführt. In dieser Lavageflüssigkeit wurden die folgenden Parameter gemessen:

Die LDH-Aktivität und der Proteingehalt wurden analysiert, um mögliche toxische Effekte zu ermitteln. Ein signifikanter Anstieg bei der LDH-Bestimmung in den SLN30-Behandlungsgruppen konnte nicht gemessen werden. Die LDH-Messung an Tag 8 und Tag 12 zeigte lediglich leicht erhöhte Werte für die 200- μ g-SLN30-Behandlungsgruppe und für die mit Carbon Black behandelten Tiere (Abb. 20). An Tag 16 wurde eine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität für die Positivkontrolle (Carbon-Black-Behandlungsgruppe) gemessen, während alle anderen Behandlungsgruppen unbeeinflusst blieben.

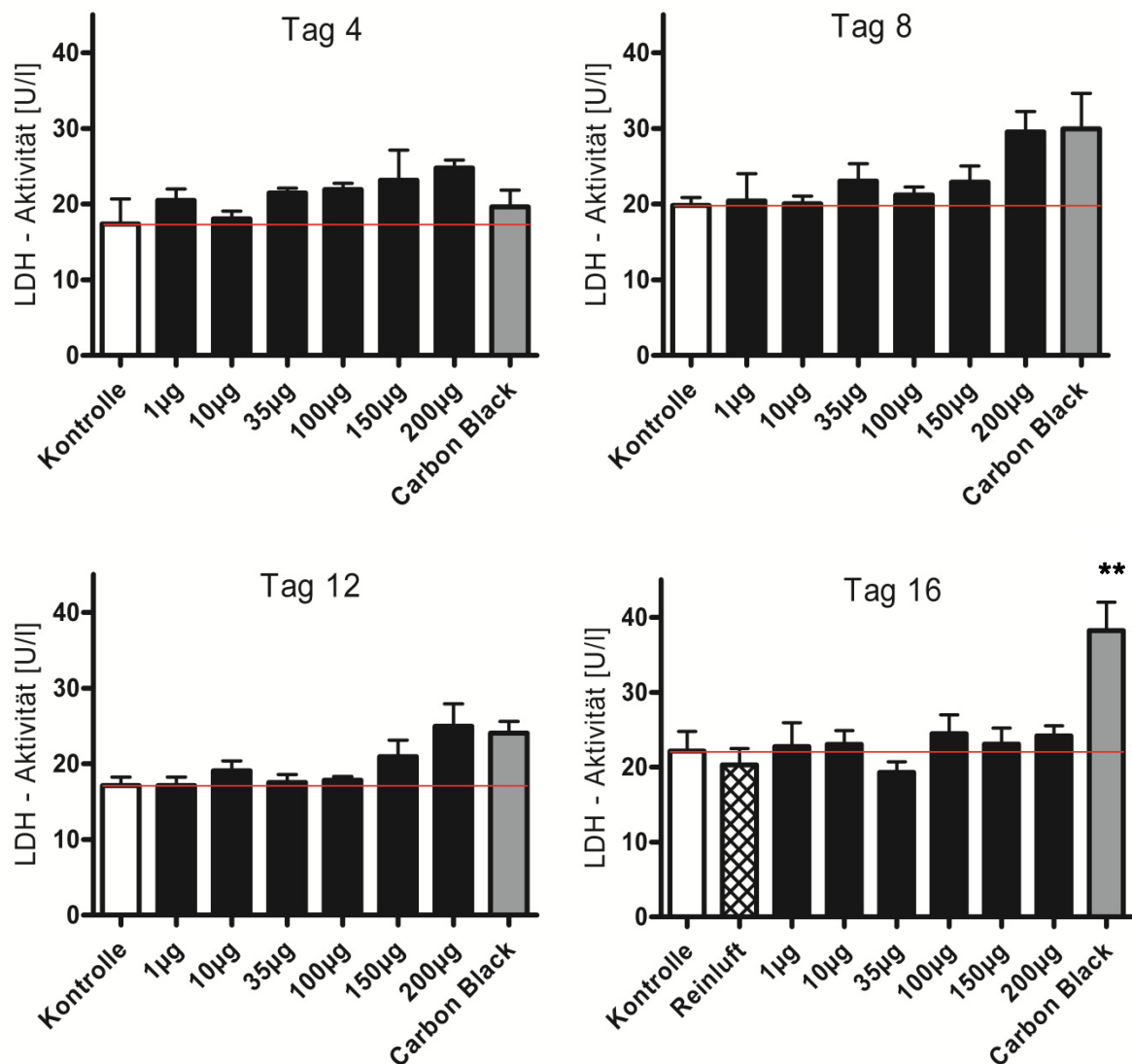


Abb. 20: LDH-Aktivität in der BAL zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

Die Lungen wurden 24 h nach der letzten Behandlung lavagiert und die LDH-Aktivität ermittelt. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. Die rote Linie stellt den Basalwert der LDH-Aktivität dar. ** $p < 0,001$ gegen Vehikelkontrolle, $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes zeigte an den vier verschiedenen Analysezeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen (Abb. 21).

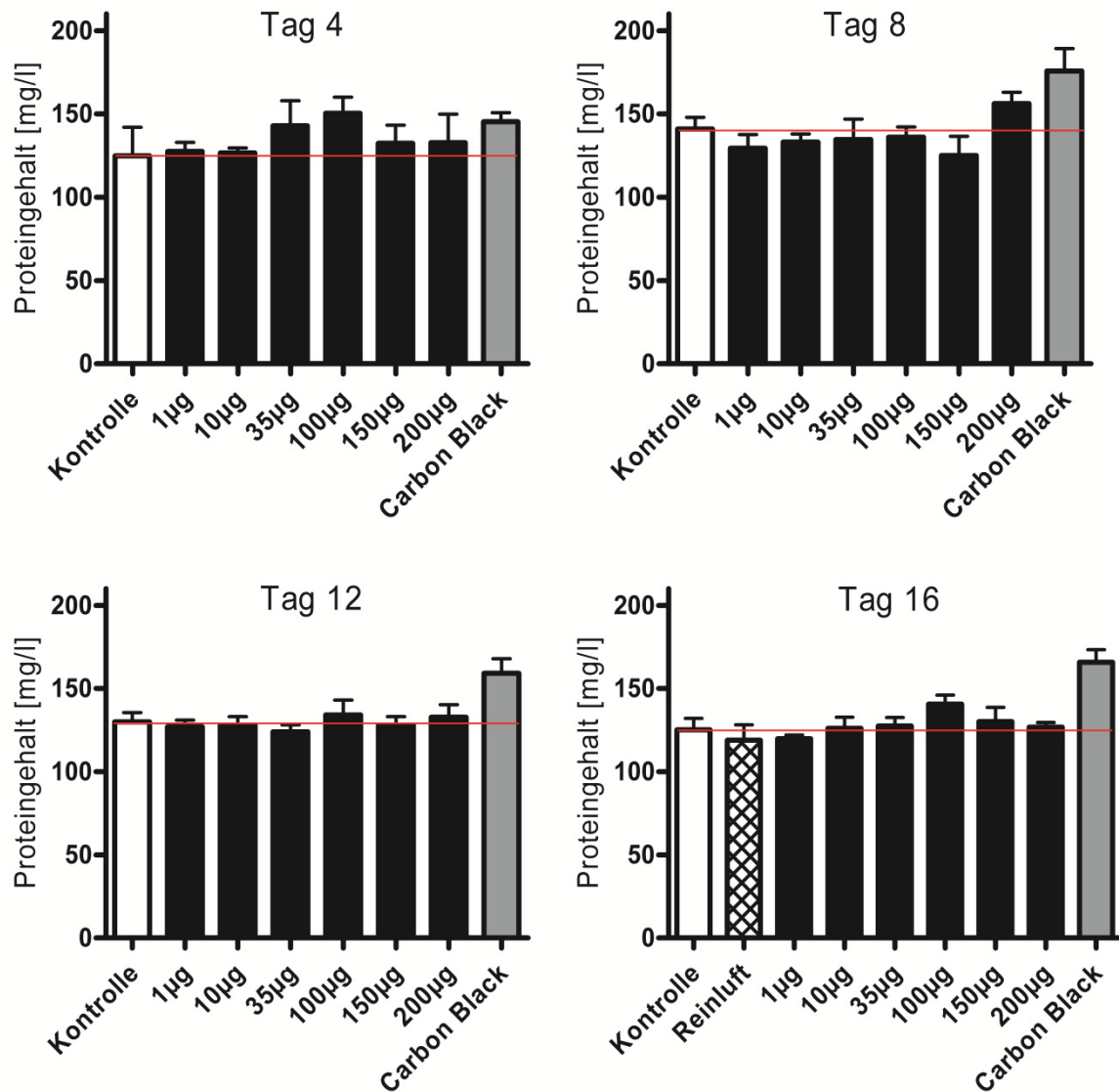


Abb. 21: Gesamtproteingehalt in der BAL zu den verschiedenen Analysezeitpunkten
24 h nach der letzten Behandlung wurde eine BAL durchgeführt und darin der Proteingehalt bestimmt. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. Die rote Linie stellt den Basalwert des Proteingehaltes dar. $n = 6$, \pm SEM

4.1.3.1 Bestimmung des inflammatorischen Potenzials

Um ein inflammatorisches Ansprechen des Lungenparenchyms auf die inhalative Gabe der Nanosuspensionen zu ermitteln, wurden die proinflammatorischen Zytokine KC, TNF- α und IL-6 gemessen. Die Quantifizierung des Chemokin-KC-Spiegels in der BAL zeigte teilweise eine inkonsistente, erhöhte KC-Ausschüttung (z.B. Tag 4: 10 μg ; Tag 12: 100 μg). Dies verdeutlicht, dass KC ein sehr sensibler Marker ist, der sehr schnell hochreguliert wird (Abb. 22). Im Gegensatz zu den SLN30-Behandlungsgruppen wurde ab Tag 12 in der Carbon-Black-Behandlungsgruppe eine konsistente Erhöhung der Chemokin-Ausschüttung beobachtet. Diese hochregulierte Chemokin-Ausschüttung war an den Analysetagen 12 und 16 signifikant.

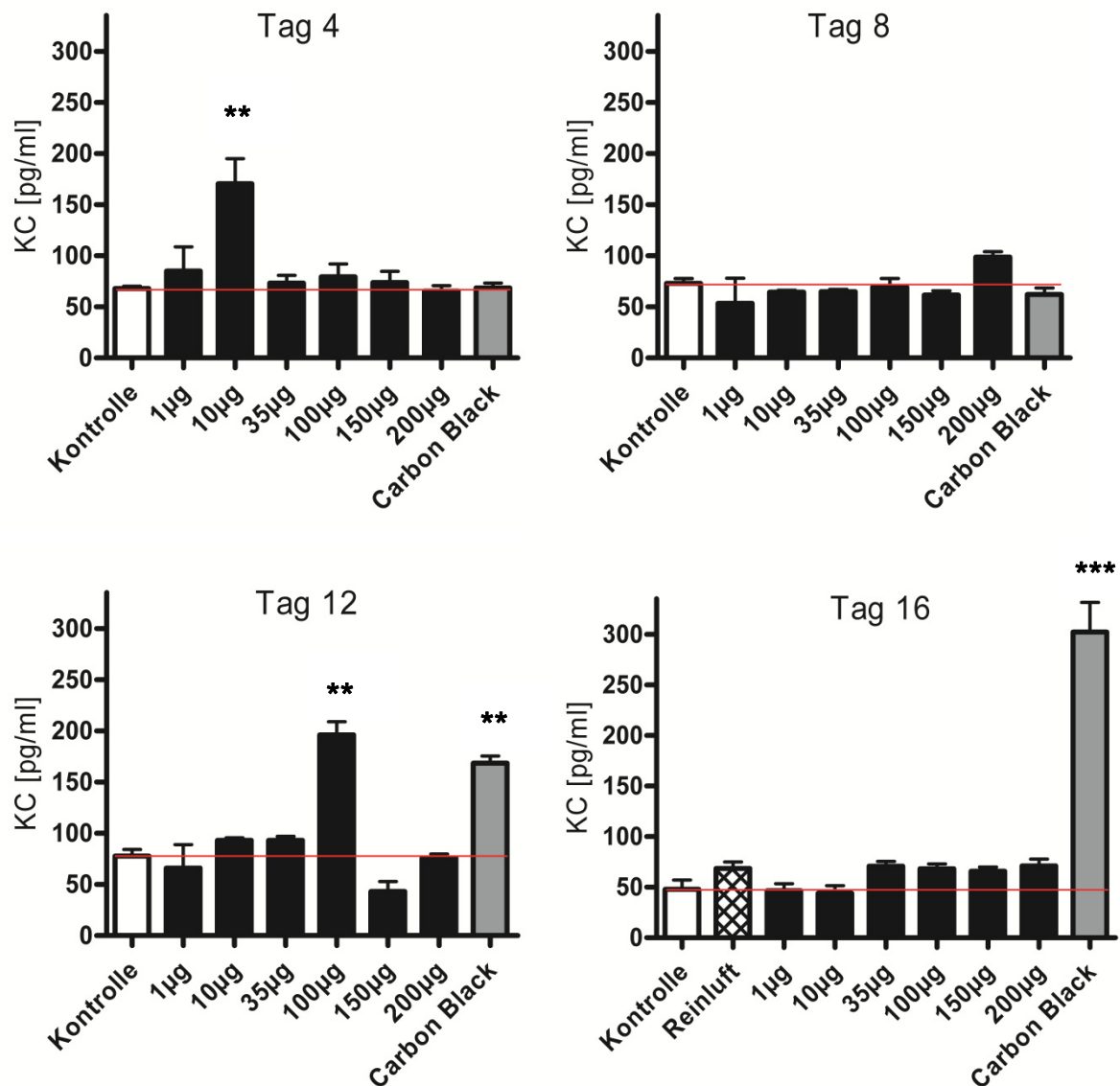


Abb. 22: Chemokin-KC-Konzentration in der BAL zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

Die Konzentration von Chemokin KC wurde 24 h nach inhalativer Behandlung mit SLN30 in der BAL gemessen. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. Die rote Linie stellt den Basalwert der KC-Ausschüttung dar. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ gegen Vehikelkontrolle. $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Die mit Carbon Black behandelten Gruppen zeigten eine signifikant erhöhte TNF- α -Konzentration in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 23). In den SLN-Behandlungsgruppen wurden, bis auf die höchste Konzentration zum letzten Analysezeitpunkt keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

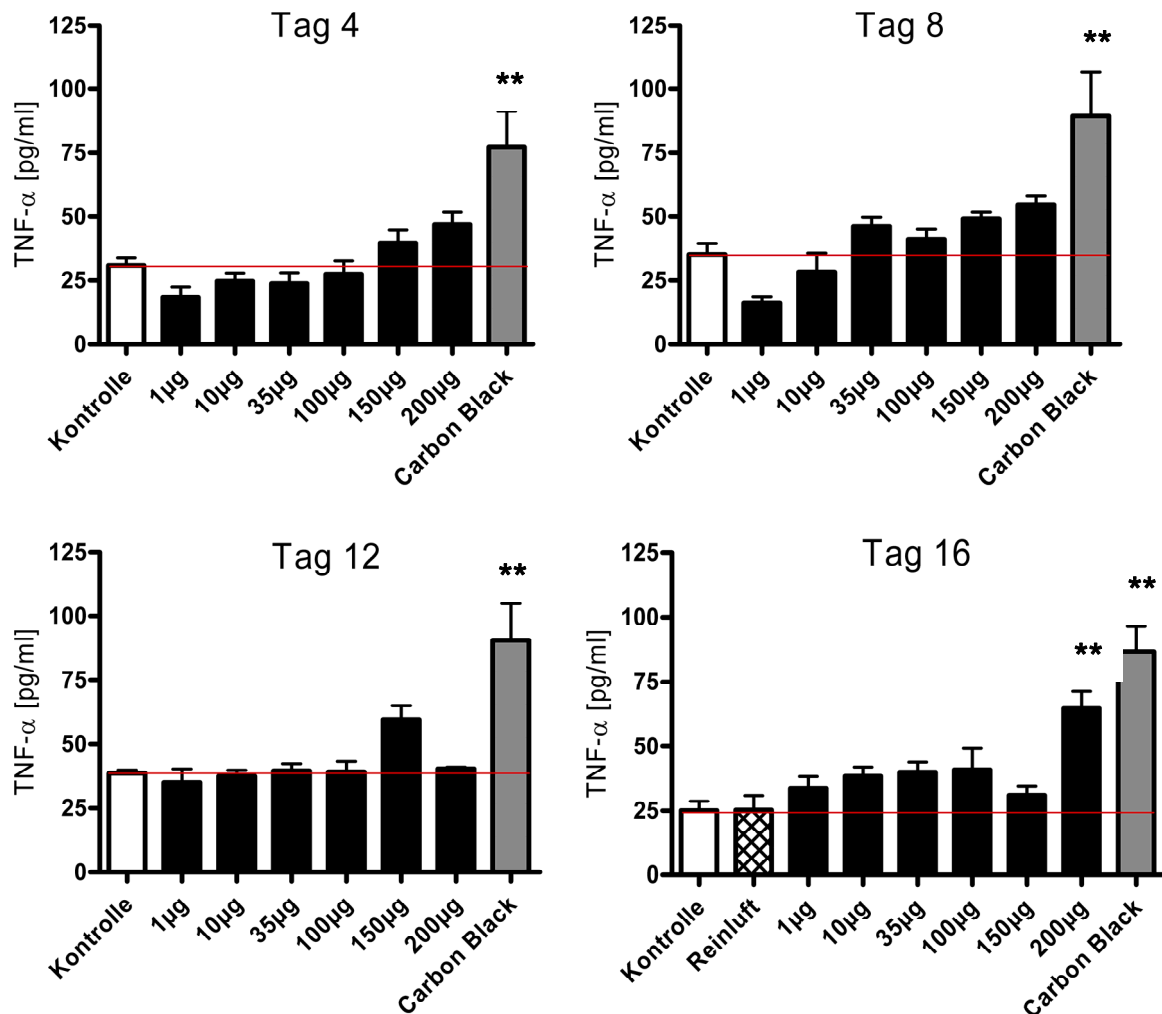


Abb. 23: TNF- α -Konzentration in der BAL zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

Die Konzentration von TNF- α wurde 24 h nach inhalativer Behandlung mit SLN30 in der BAL gemessen. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. Die rote Linie stellt den Basalwert der TNF- α -Ausschüttung dar. ** p < 0,001 gegen Vehikelkontrolle. n = 6, $\bar{x} \pm$ SEM

Die Bestimmung von IL-6 wies zu allen vier Analysenzeitpunkten bei keiner Behandlungsgruppe eine Induktion dieses Zytokins auf (Abb. 24).

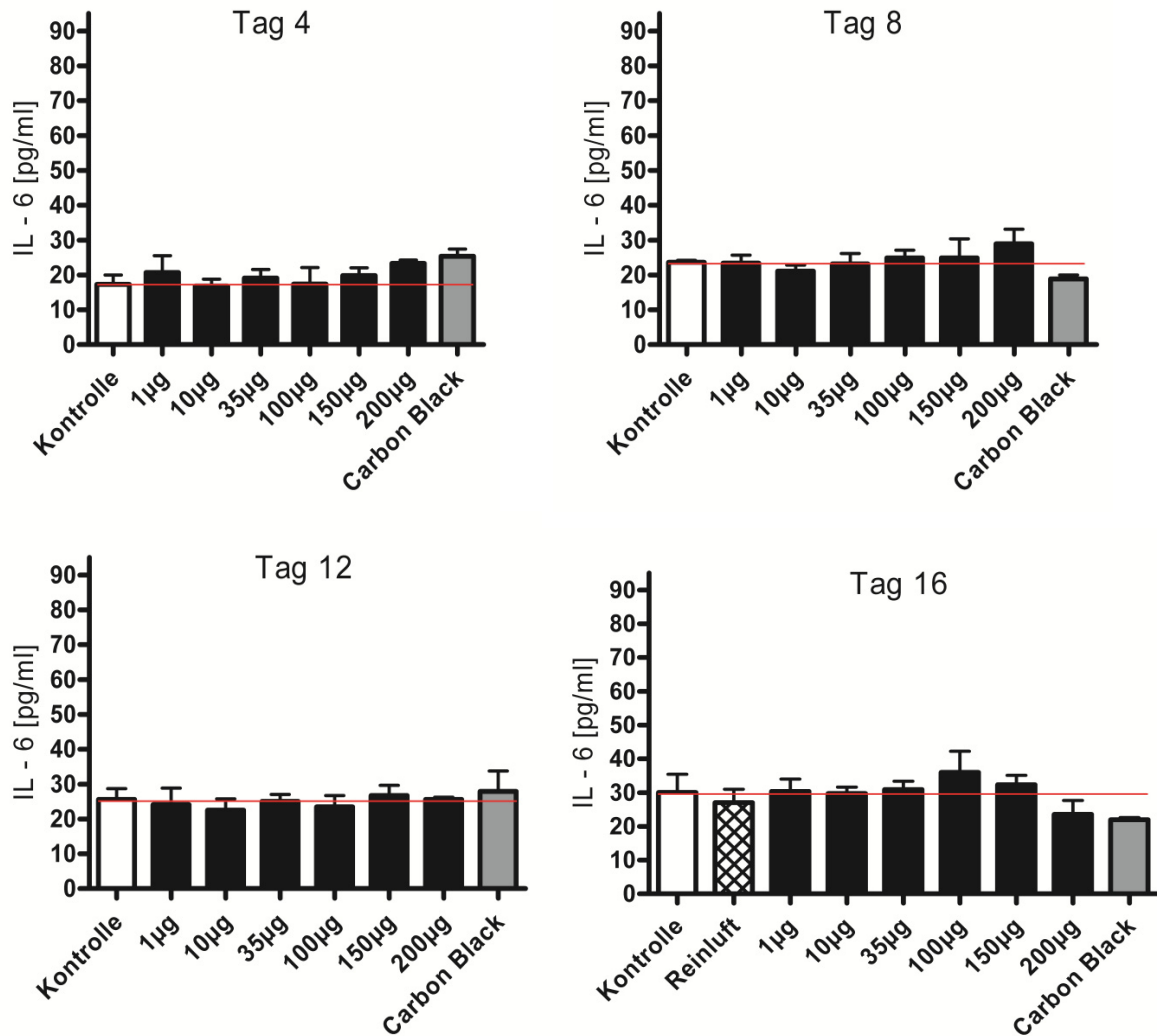


Abb. 24: IL-6-Konzentration in der BAL zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

Die Konzentration von IL-6 wurde 24 h nach inhalativer Behandlung mit SLN30 in der BAL gemessen. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. Die rote Linie stellt den Basalwert der IL-6-Sekretion dar. $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Um eine mögliche entzündliche Reaktion aufgrund der SLN weiter zu charakterisieren, wurden die Gesamtzellzahlen in der BALF ermittelt und anschließend in Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten differenziert.

Bei der Untersuchung der Gesamtzellzahl konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 25). Nach der Differenzierung der BAL-Zellen ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Makrophagenanteils für die SLN-Behandlungsgruppen (Abb. 26). Nach Carbon-Black-Behandlung war allerdings der Anteil an Makrophagen signifikant verringert. Diese Verringerung des Makrophagenanteils in der BAL der Positivkontrolle (Carbon Black) potenzierte sich von Analysezeitpunkt zu Analysezeitpunkt.

Ein Einstrom von zellulären Entzündungsmediatoren wie neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten wurde für die SLN30-Behandlungsgruppen im gesamten Untersuchungszeitraum nicht beobachtet (Abb. 27 und 28). Die Carbon-Black-Behandlung führte neben dem signifikanten Einstrom von Neutrophilen ab Tag 4 auch zu einem signifikanten Anstieg des prozentualen Lymphozytenanteils in der BAL ab dem gleichen Zeitpunkt für den gesamten Untersuchungszeitraum.

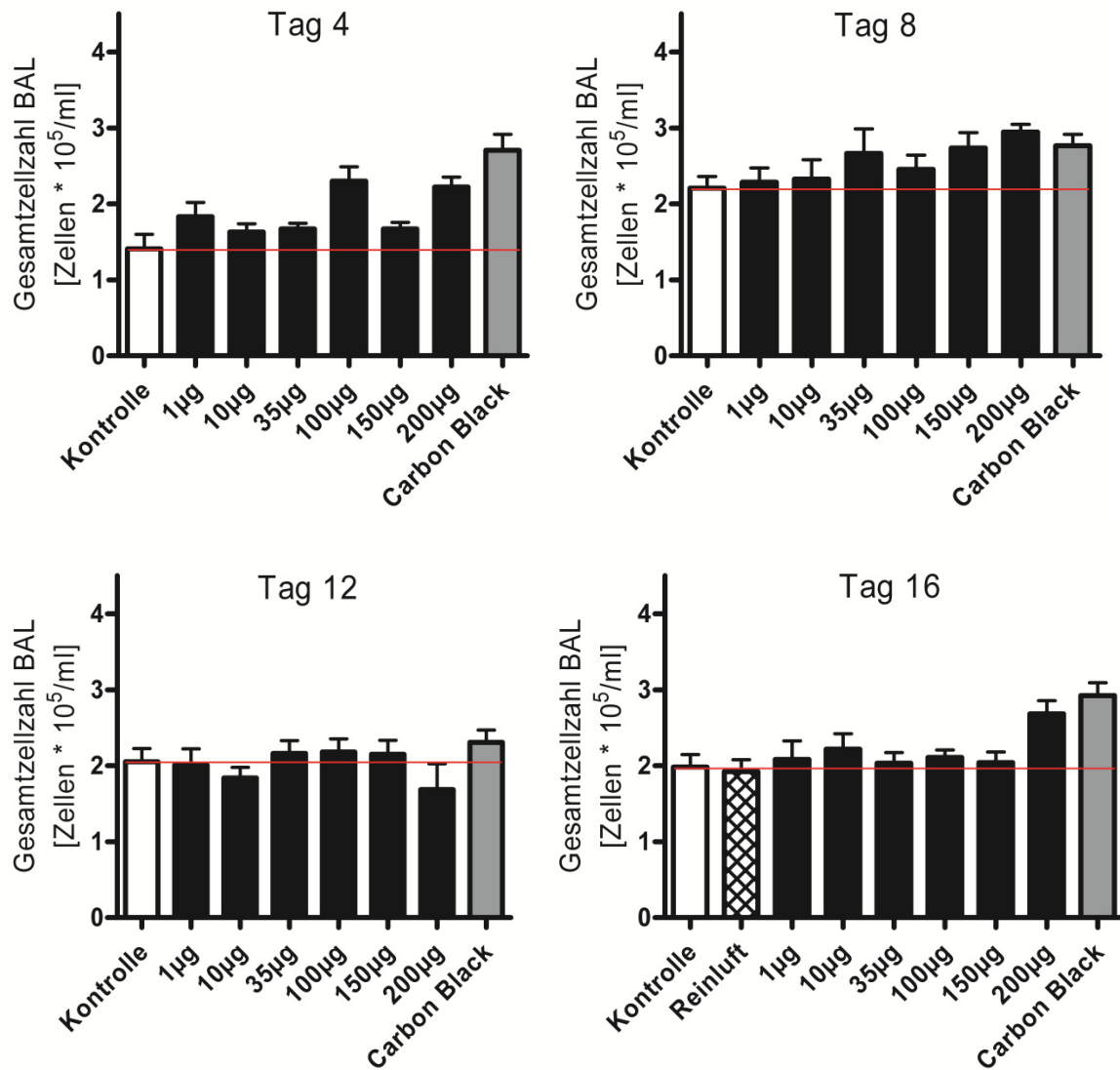


Abb. 25: Gesamtzellzahl in der BAL zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

Die Gesamtzellzahl in der BAL wurde 24 h nach Exposition der Tiere mit SLN30 bestimmt. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. Die rote Linie stellt den Basalwert der Gesamtzellzahl dar. $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

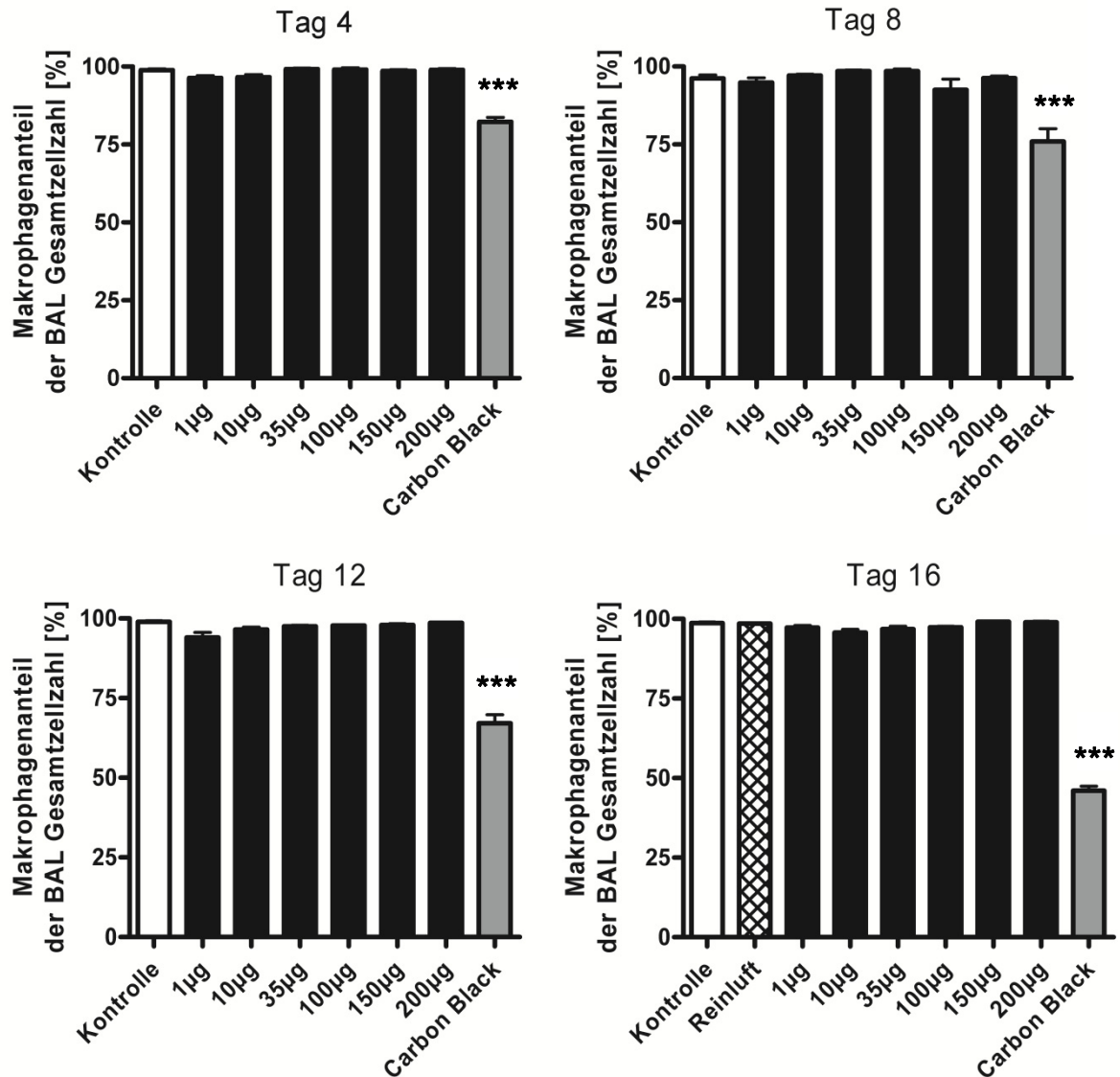


Abb. 26: Prozentualer Anteil von Makrophagen an der BAL-Gesamtzellzahl zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

24 h nach Exposition der Tiere mit SLN30 wurde eine BAL durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in der BAL gezählt und differenziert. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. *** $p < 0,0001$ gegen Vehikelkontrolle, $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

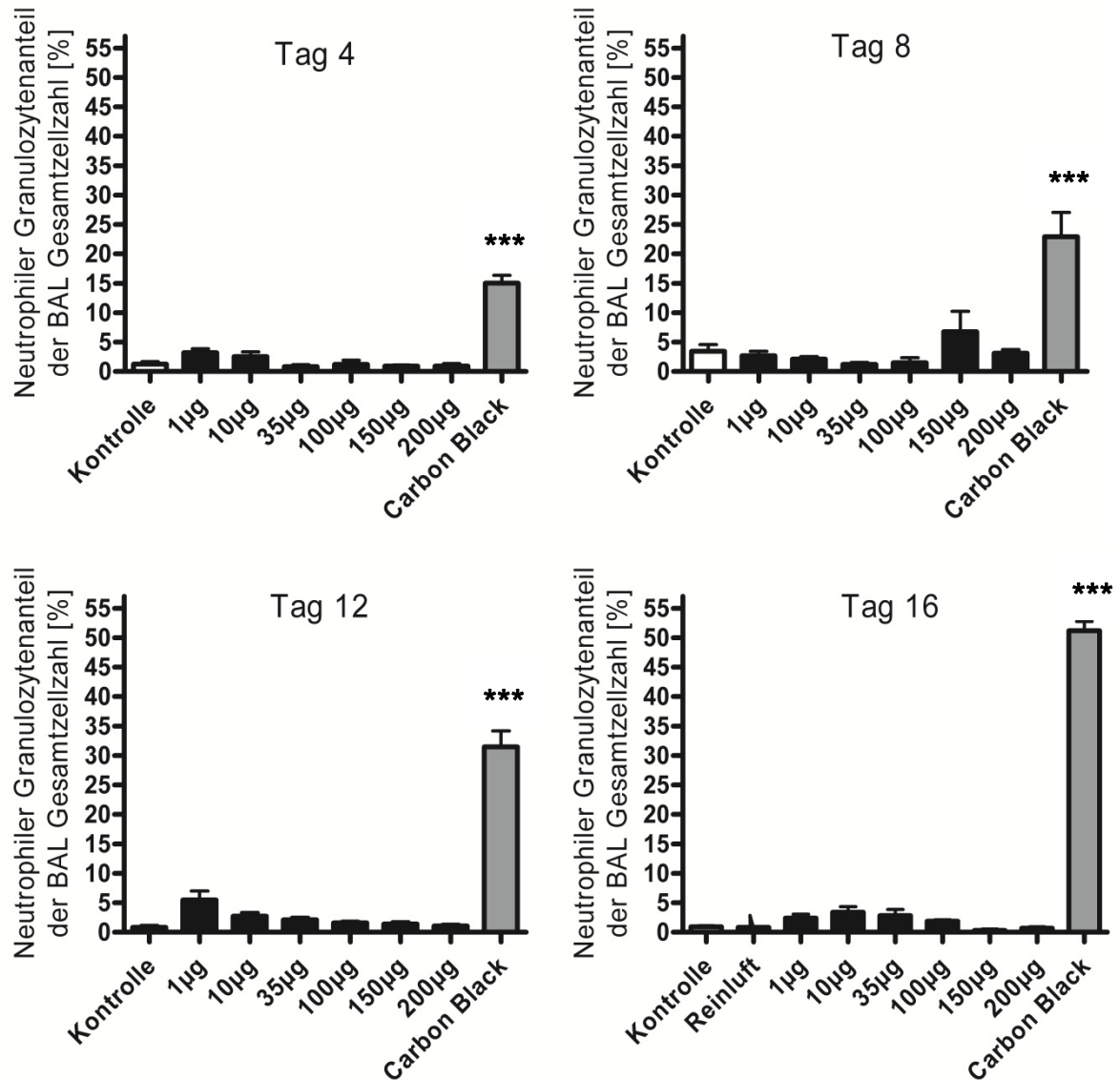


Abb. 27: Prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten an der BAL-Gesamtzellzahl zu den verschiedenen Analysezeitpunkten

24 h nach Exposition der Tiere mit SLN30 wurde eine BAL durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in der BAL gezählt und differenziert. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysenzeitpunkt. *** $p < 0,0001$ gegen Vehikelkontrolle, $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

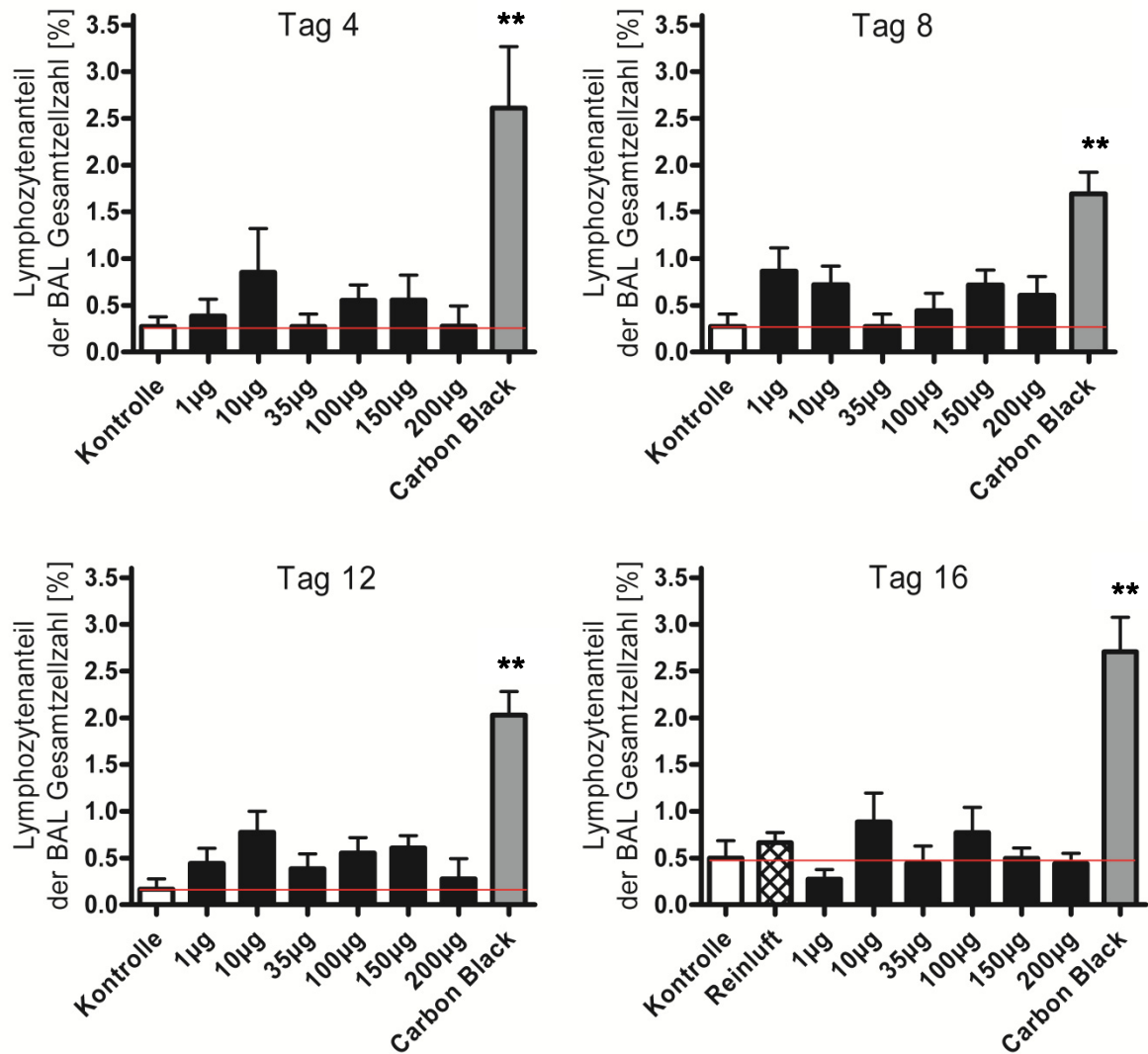


Abb. 28: Prozentualer Anteil von Lymphozyten an der BAL-Gesamtzellzahl an den verschiedenen Analysezeitpunkten

24 h nach Exposition der Tiere mit SLN30 wurde eine BAL durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in der BAL gezählt und differenziert. Die mit Tag 4-16 bezeichneten Überschriften in den Graphen bestimmen den jeweiligen Analysezeitpunkt. Die rote Linie stellt den Basalwert des Lymphozytenanteils an der BAL-Gesamtzellzahl dar. ** $p < 0,001$ gegen Vehikelkontrolle, $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Um die Auswirkungen der SLN nach 16 Tagen Inhalation besser einschätzen zu können, wurden neben den Lungen auch die Leber, Nieren und Milz der Behandlungstiere entnommen und von einem erfahrenen Pathologen (Dr. Rittinghausen, Fraunhofer ITEM, Hannover) histopathologisch untersucht.

Die Auswertung ergab, dass das mikroskopische Erscheinungsbild des Lungenparenchyms innerhalb der normalen Schwankungen lag. Im Lungenparenchym aller Tiere der SLN- und Carbon-Black-Behandlungsgruppen wurden vereinzelt Agglomerate von Partikeln in den Alveolarmakrophagen gefunden (Abb. 29). Die Partikel der SLN-Gruppen erschienen farblos in den HE-Gewebeschnitten, während die Partikel der Carbon-Black-Gruppen schwarz und dicht gepackt vorlagen. Ferner zeigten die Alveolarmakrophagen der SLN-Gruppen eine Art Vakuolisierung.

Die Lebern von 172 der 199 Tiere zeigten sehr leichte fokale oder multifokale Mikrogranulome, die Entzündungszellen enthielten. Diese Befunde ließen sich in allen Behandlungsgruppen einschließlich der Negativ- bzw. Vehikelkontrolle und der Reinluftkontrolle feststellen und waren nicht behandlungsassoziiert. Die Nieren von drei Carbon-Black-Tieren ließen eine moderate peripelvine einkernige Zellinfiltration und eine moderate entzündliche Infiltration des Nierenbeckens nach 16 Behandlungstagen erkennen. Die Untersuchung der Milzorgane zeigte keine Anzeichen einer Entzündung.

Die histopathologischen Untersuchungsergebnisse wiesen auf eine akzeptable systemische Verträglichkeit der inhalierten SLN-Aerosole hin.

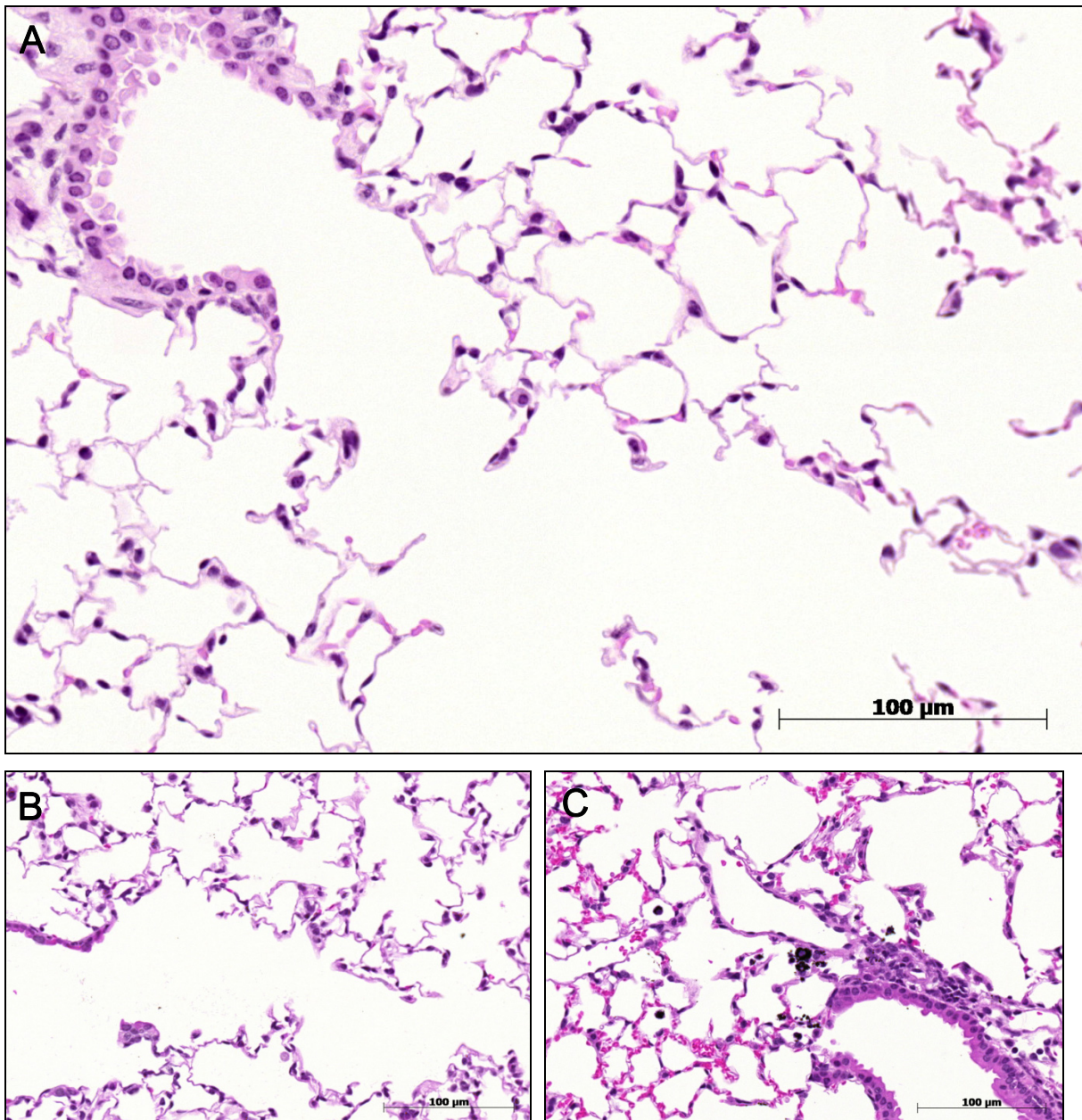


Abb. 29: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von HE-Färbungen des bronchiolo-alveolären Gewebes der Behandlungsgruppen nach 16 Tagen inhalativer Behandlung

A) 200 µg deponierte Dosis SLN30; B) Negativkontrolle (200 µg deponierte Dosis Solutollösung); C) Positivkontrolle (150 µg deponierte Dosis Carbon Black)

4.2 Arzneistoffbeladung und Charakterisierung der arzneistoffhaltigen Lipidmatrix und der Nanosuspensionen

Nachdem im Abschnitt 4.1 die Untersuchungen des toxischen und inflammatorischen Potenzials der SLN gezeigt haben, dass die Nanosuspensionen bis zu einer deponierten Dosis von 200 µg gut verträglich sind, befasst sich der folgende Abschnitt mit der Beladung der Lipidmatrix der SLN30-Nanosuspensionen mit dem Modellarzneistoff Dexamethason bzw. Dexamethason-21-phosphat und der Beladung der Nanosuspensionen selbst sowie der anschließenden Charakterisierung des arzneistoffhaltigen Systems.

4.2.1 Herstellung und Charakterisierung der arzneistoffhaltigen Lipidmatrix

4.2.1.1 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen dexamethasonhaltiger LM

Zur weiteren Charakterisierung der arzneistoffbeladenen Lipidmatrix wurden die Proben polarisationsmikroskopisch untersucht. Abbildung 30 zeigt Aufnahmen der erstarrten Systeme. Die Präparate zeigten dabei ein anisotropes Bild mit dichter Textur, welche durch das kristalline Hartfett hervorgerufen wird. Unterschiede zwischen Dexamethason und Dexamethason-21-phosphat konnten dabei nicht festgestellt werden. Ebenso wenig waren Wirkstoffkristalle vor dem kristallinen Hintergrund des Hartfetts identifizierbar.

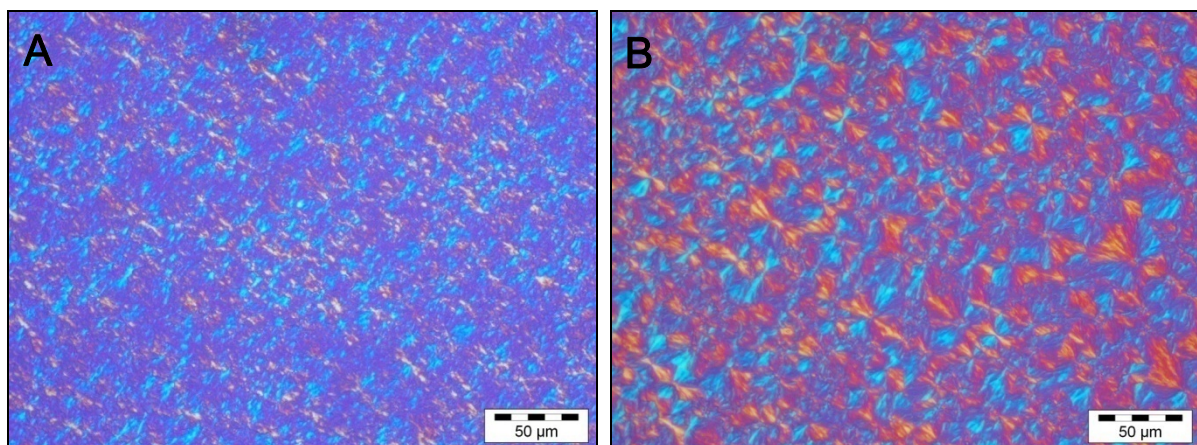


Abb. 30: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der erstarrten Lipidmatrices

A) Unbeladene LM; B) Lipidmatrix mit 1 % Dexamethason

Daher wurden die erstarrten, dexamethasonhaltigen Lipidmatrices unter dem Mikroskop mit einer konstanten Heizrate von 10 °C/min bis zum Verschwinden anisotroper Strukturen aufgeheizt. Bei einer Temperatur von 59-60 °C lag eine vollständige Schmelze vor.

In den Dexamethason enthaltenden Systemen konnte eine solubilisierbare Konzentration von 2 % (m/m) ermittelt werden (Abb. 31 Bild A). Bei einer Erhöhung der Dexamethasonkonzentration auf 2,2 % (m/m) wurden bereits nichtsolubilisierbare Anteile des Arzneistoffs beobachtet (Abb. 31 Bild B, schwarze Pfeile).

Bei der Einarbeitung des polaren Dexamethasonsalzes wurden schon bei einer Arzneistoffkonzentration von 0,5 % (m/m) Arzneistoffkristalle beobachtet. Während des Schmelzvorganges wurden weitere Texturen beobachtet, die in der vorliegenden Arbeit nicht näher charakterisiert werden sollen. Da das polare Dexamethasonsalz deutlich schlechter in der Lipidmatrix solubilisierbar war als Dexamethason selbst, wurde der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen auf den letztgenannten Arzneistoff gelegt.

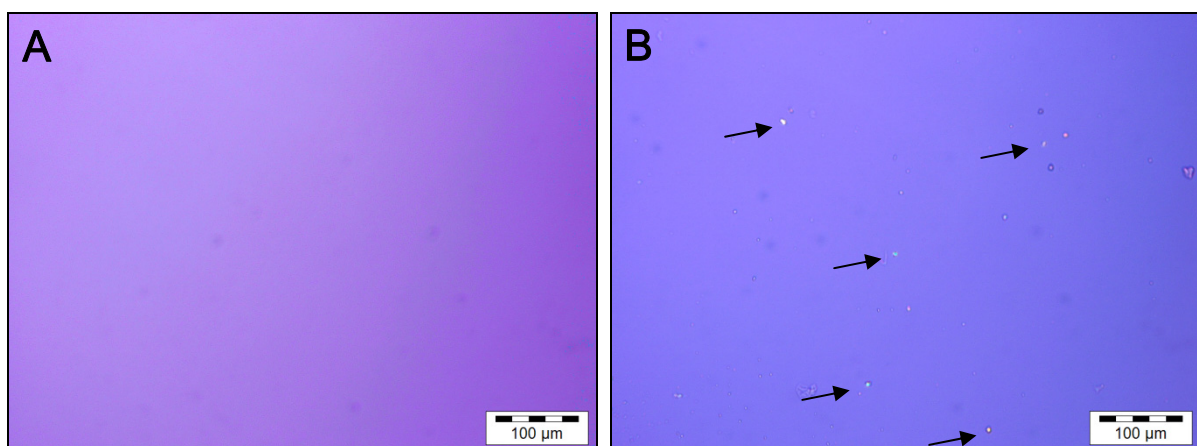


Abb. 31: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der geschmolzenen Lipidmatrices

A) LM mit 2 % Dexamethason; B) LM mit 2,2 % Dexamethason, —→ nichtsolubilierte Arzneistoffkristalle

4.2.1.2 Röntgenuntersuchungen (WAXD) dexamethasonhaltiger LM

Um weitere Informationen über das Kristallisationsverhalten von Dexamethason in der Lipidmatrix zu erhalten, wurden diese Systeme mit Hilfe der Röntgenweitwinkelbeugung untersucht. Die Proben wurden 24 Stunden nach der Herstellung, nach 3 Wochen und nach 3 Monaten untersucht. Abbildung 32 ist zu entnehmen, dass die Reinsubstanz Dexamethason (grün dargestellt) ausgeprägte Interferenzen bei $2\theta = 14,3^\circ$ und $2\theta = 17,0^\circ$ aufweist.

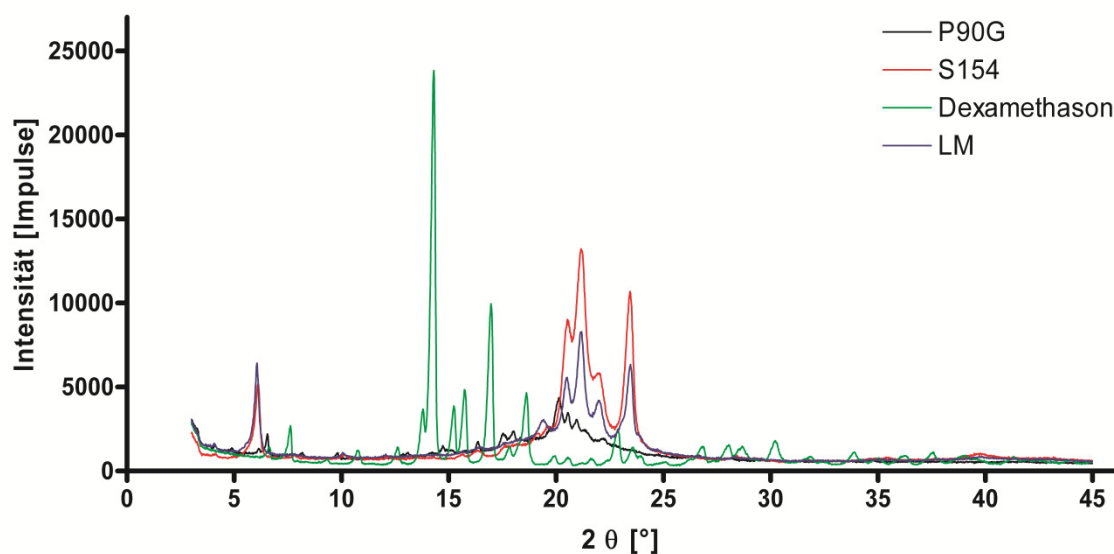


Abb. 32: WAXD-Diffraktogramm der Reinsubstanzen P90G, S154, Dexamethason ohne Vorbehandlung. Zusätzlich ist noch die Lipidmatrix (LM) der SLN30 24 h nach Herstellung dargestellt.

Werden 2 % (m/m) Dexamethason in der Lipidmatrix suspendiert (rosa dargestellt), so lassen sich keine dem Arzneistoff zuzuordnenden Interferenzen feststellen.

Bei einer Einarbeitung von 4 % (m/m) des Arzneistoff in die Lipidmatrix werden die Leitpeaks des Dexamethasons in den Diffraktogrammen wieder sichtbar (Abbildung 33, Pfeile). Dies bedeutet, dass der Arzneistoff nicht mehr komplett gelöst in der Lipidmatrix vorliegt und somit größere Anteile in kristalliner Form vorliegen.

Nach einer Lagerung der Lipidmatrices für 3 Wochen bzw. 3 Monate zeigten sich keine Veränderungen in den jeweiligen Diffraktogrammen im Vergleich zu den Ergebnissen nach 24-stündiger Lagerung.

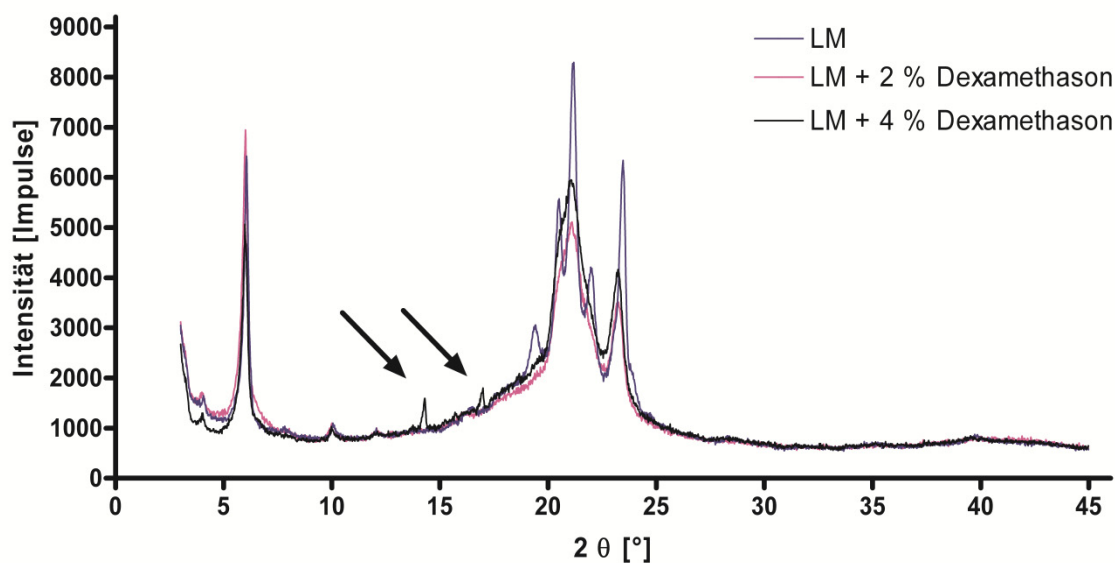


Abb. 33: WAXD-Diffraktogramm der unbeladenen LM, der mit 2 % und 4 % Dexamethason beladenen LM 24 Stunden nach Herstellung. Pfeile siehe Text.

4.2.2 Charakterisierung der arzneistoffhaltigen Nanosuspension

4.2.2.1 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen dexamethasonhaltiger Nanosuspensionen

Nachdem polarisationsmikroskopisch gezeigt werden konnte, dass bei einer Dexamethasonkonzentration von 2 % (m/m) keine Arzneistoffkristalle in der Lipidmatrix vorliegen, wurde mit dieser LM eine Nanosuspension hergestellt. Diese Nanosuspension wurde anschließend polarisationsmikroskopisch untersucht. Wie in Abbildung 34 Bild C deutlich zu erkennen ist, sind in der Dexamethason enthaltenden Nanosuspension Arzneistoffkristalle nachweisbar. Bei Verringerung der Beladungskapazität der LM von 2 % (m/m) auf 1 % (m/m) Dexamethason und anschließender Hochdruckhomogenisation wurde keine Kristallbildung ermittelt.

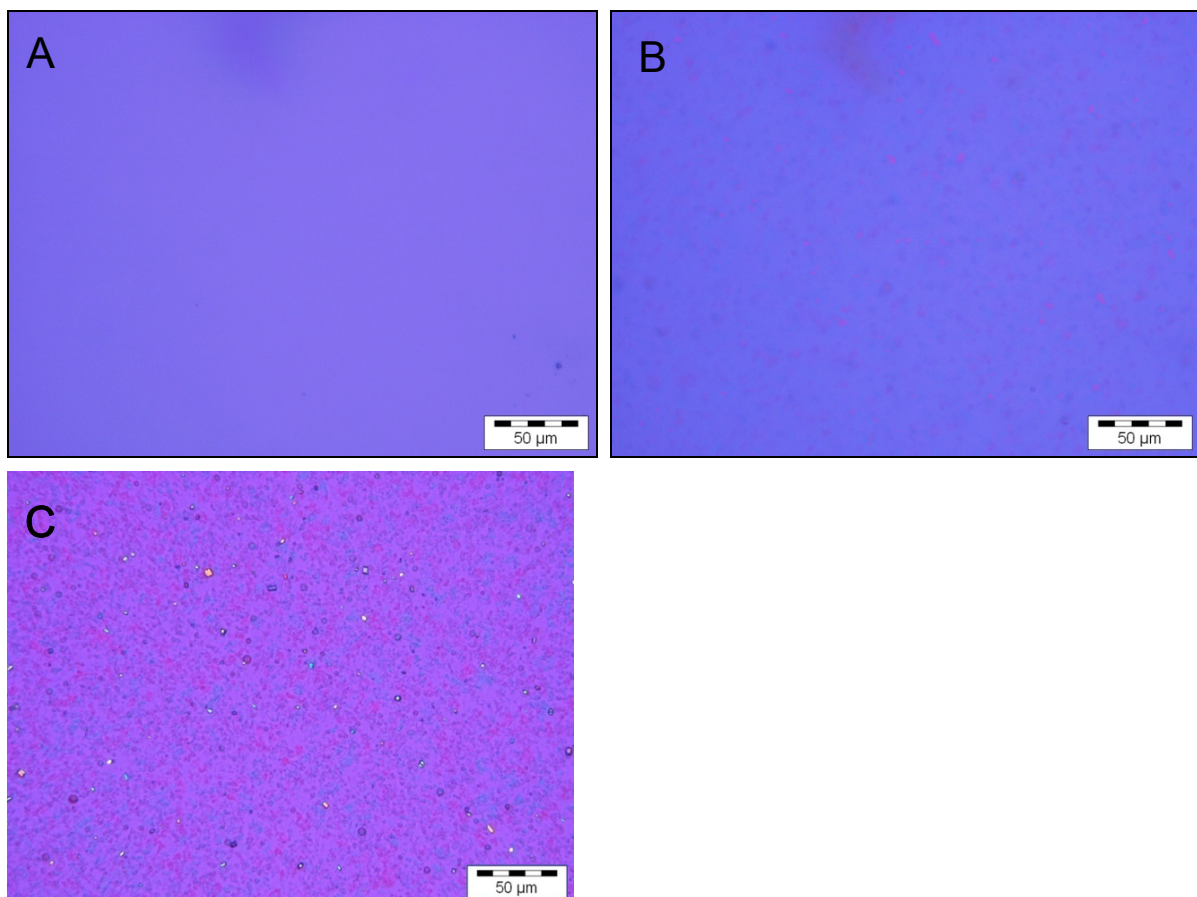


Abb. 34: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Nanosuspensionen

A) Unbeladene Nanosuspension; B) Nanosuspension mit 1 % Dexamethason; C) Nanosuspension mit 2 % Dexamethason

4.2.2.2 Röntgenuntersuchungen (WAXD) dexamethasonhaltiger Nanosuspensionen

Um zusätzliche Informationen über mögliche Rekristallisationsvorgänge von Dexamethason in den SLN zu erhalten, wurden diese Systeme mit Hilfe der Röntgenweitwinkelbeugung untersucht. Die polarisationsmikroskopischen Ergebnisse konnten dabei nicht verifiziert werden. Nach dem Homogenisieren der 2-prozentigen (m/m) Dexamethason-LM waren in den Nanosuspensionen durch die Weitwinkelröntgendiffraktometrie keine kristallinen Strukturen nachweisbar (Abb. 35).

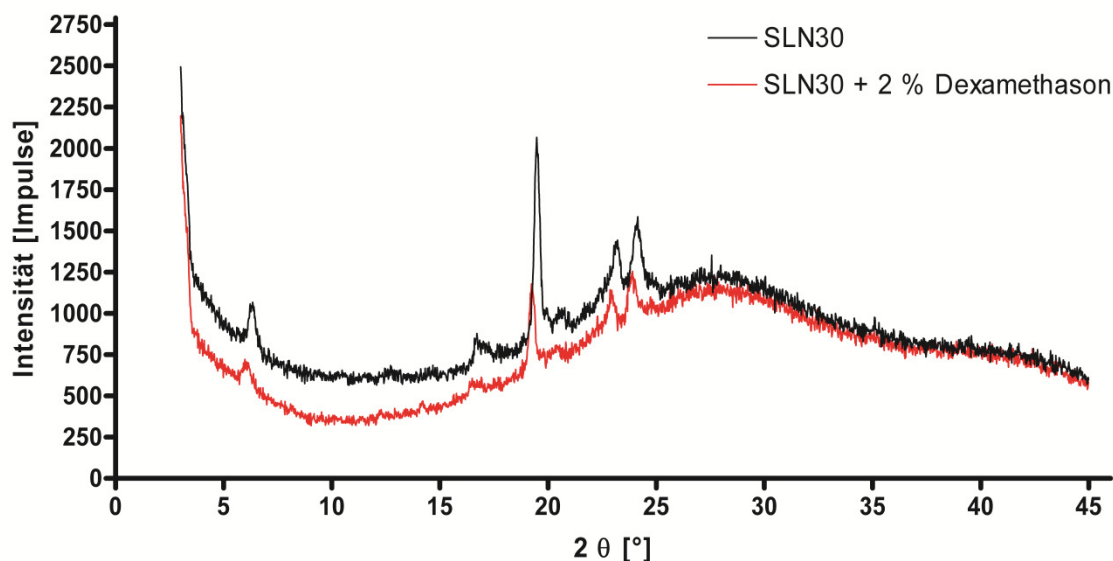


Abb. 35: WAXD-Diffraktogramm von SLN30 und SLN30 mit 2 % Dexamethason in der Lipidmatrix

4.2.2.3 Untersuchungen zur Arzneistoffbeladungsrate dexamethason-haltiger Nanosuspensionen

Im Anschluss an die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen wurde die Arzneistoffbeladungsrate ermittelt und dadurch näherungsweise auf die Einschlusseffizienz geschlossen. Für die Bestimmung der beiden Größen wurde eine indirekte Methode verwendet. Die mit 1 % Dexamethason beladenen Nanosuspensionen wurden in Vivaspin-Konzentratoren (MWCO 300.000 Da) zentrifugiert. Dadurch erhielt man ein Filtrat, das partikelfrei war und den freien Anteil an Dexamethason enthielt. Die Lipidnanopartikel und zusammen mit diesen der inkorporierte bzw. adsorbierte Arzneistoff wurden vom Filter zurückgehalten. Mit Hilfe einer HPLC-Methode konnte eine Gehaltsbestimmung des im Filtrat enthaltenen Dexamethasons durchgeführt werden. Anschließend konnte auf die Arzneistoffbeladungsrate rückgeschlossen werden. Die Ermittlung des Dexamethason-

gehaltenes im Filtrat lieferte ein Ergebnis von 26 µg/ml, was einem prozentualen Anteil von 0,03 entsprach. Dadurch ergab sich rechnerisch eine Einschlusseffizienz von 99,97 %, was wiederum für eine Verkapselungsrate von 1 % sprach.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei einer Inkorporation von 1 % Dexamethason in die LM der Arzneistoff vollständig in die Lipidnanopartikel inkorporiert ist oder an diese adsorbiert ist.

4.3 Partikelcharakterisierungen

In diesem Abschnitt wird speziell auf die Partikelgrößen der unterschiedlichen Nanosuspensionen eingegangen. Als zusätzlicher Parameter wurde für ausgewählte Zubereitungen das Zetapotenzial bestimmt.

4.3.1 Partikelcharakterisierung nach Farbstoffmarkierung

Um die Lipidnanopartikel in den verschiedenen Zellen wieder finden zu können, wurden sie mit einem lipophilen Farbstoff markiert. Nach der Markierung der SLN30 mit den Fluoreszenzfarbstoffen bewegen sich diese in einem Größenbereich zwischen 90 und 120 nm. Die Inkorporation des Farbstoffs DiD hatte eine Partikelvergrößerung um ca. 6 nm und die von DiI um 23 nm zur Folge. Bei der Markierung mit Coumarin 6 wurde eine geringe Verkleinerung der Partikelgröße festgestellt (Tabelle 4). Die Polydispersitätsindices lagen bei diesen Formulierungen zwischen 0,1 und 0,2, was für enge und nahezu monodisperse Partikelgrößenverteilungen spricht. Die Nanosuspensionen zeigten mit Werten zwischen -13 mV und -26 mV alle ein negatives Zetapotenzial.

Tabelle 4: Eigenschaften der SLN30 nach Markierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen
Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 15 Experimenten \pm SEM.

Nanopartikelformulierung	z-average [nm]	PDI	Zetapotenzial [mV]
SLN30	94,07 \pm 1,23	0,146 \pm 0,0058	-20,47 \pm 3,14
SLN30 - DiI	117,0 \pm 6,67	0,170 \pm 0,0088	-13,47 \pm 0,64
SLN30 - DiD	100,5 \pm 0,94	0,133 \pm 0,0038	-26,80 \pm 0,17
SLN30 - Coumarin 6	92,95 \pm 2,75	0,141 \pm 0,0050	-13,65 \pm 2,35

4.3.2 Partikelcharakterisierung nach Dexamethason-Beladung

Nachdem festgestellt wurde, dass bei einer Beladung der LM mit 1 % Dexamethason der Arzneistoff vollständig gelöst vorlag, wurde diese Nanopartikelformulierung näher charakterisiert. Dabei konnte eine Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers (z-average) von 94 nm auf 120 nm festgestellt werden (Tabelle 5). Der Polydispersitätsindex stieg nach Beladung mit Dexamethason marginal an, was immer noch auf eine nahezu monodisperse Größenverteilung hindeutet. Das Zetapotenzial stieg von -20 mV auf -16 mV an.

Tabelle 5: Eigenschaften der SLN30 nach Beladung mit Dexamethason

Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 9 Experimenten \pm SEM.

Nanopartikelformulierung	z-average [nm]	PDI	Zetapotenzial [mV]
SLN30	94,07 \pm 1,23	0,146 \pm 0,0058	-20,47 \pm 3,14
SLN30 - 1 % Dexamethason	120,0 \pm 4,30	0,157 \pm 0,0123	-16,43 \pm 0,55

4.3.3 Partikelcharakterisierung nach Gammastrahlen-Sterilisation

Um eine Kontamination der Zellkulturen mit Mikroorganismen aus den Nanosuspensionen zu verhindern, wurden diese nach der Herstellung mit Gammastrahlen sterilisiert. Der Einfluss dieser Sterilisationsmethode auf die Partikelgröße und den Polydispersitätsindex ist in Tabelle 6 dargestellt. Wie dort zu erkennen ist, ist der Einfluss nur gering. Die Partikelgröße der SLN30 stieg lediglich um 3 nm und die der Dexamethason-beladenen SLN30 um 9 nm. Der Polydispersitätsindex stieg nach Sterilisation der Nanosuspensionen leicht an, lag aber immer unter 0,2.

Tabelle 6: Eigenschaften der SLN30 nach Sterilisation mit Gammastrahlen

Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 9 Experimenten \pm SEM.

Nanopartikelformulierung	Sterilisation	z-average [nm]	PDI
SLN30	-	94,07 \pm 1,23	0,146 \pm 0,006
SLN30 - 1 % Dexamethason	-	120,0 \pm 4,30	0,157 \pm 0,012
SLN30	γ - Strahlung	97,57 \pm 0,51	0,163 \pm 0,007
SLN30 - 1 % Dexamethason	γ - Strahlung	129,4 \pm 1,60	0,197 \pm 0,006

4.3.4 Partikelcharakterisierung nach verschiedenen Lagerungszeitpunkten

Um die Stabilität der SLN30 und der mit Gammastrahlung sterilisierten SLN30-Nanosuspensionen zu überprüfen, wurden zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten die Partikelgröße und der Polydispersitätsindex bestimmt. Eine Lagerungsdauer von 12 Monaten hatte keinen signifikanten Anstieg der Partikelgröße zur Folge. Die unbehandelten SLN30 und die sterilisierten SLN30 hatten einen hydrodynamischen Durchmesser um 100 nm (Tabelle 7). Die Polydispersitätsindices lagen zwischen 0,1 und 0,2, was für eine enge und nahezu monodisperse Partikelgrößenverteilung spricht.

Tabelle 7: Eigenschaften der SLN30 nach verschiedenen Lagerungszeitpunkten
Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 6 Experimenten \pm SEM.

Nanopartikelformulierung	Lagerungszeit	z-average [nm]	PDI
SLN30	1 Tag	94,07 \pm 1,23	0,146 \pm 0,006
SLN30	1 Monat	93,33 \pm 0,50	0,199 \pm 0,005
SLN30	6 Monate	103,7 \pm 0,87	0,196 \pm 0,007
SLN30	12 Monate	100,0 \pm 0,63	0,170 \pm 0,003
SLN30 sterilisiert	1 Tag	97,57 \pm 0,51	0,163 \pm 0,007
SLN30 sterilisiert	1 Monat	95,17 \pm 0,92	0,188 \pm 0,006
SLN30 sterilisiert	6 Monate	101,5 \pm 1,08	0,176 \pm 0,008
SLN30 sterilisiert	12 Monate	98,24 \pm 0,91	0,176 \pm 0,007

4.3.5 Partikelcharakterisierung bei Variation des Homogenisators

Ein Nachteil des Avestin-Emulsiflex-C5-Homogenisators ist, dass dieser nur für ein Probenvolumen von 20-50 ml ausgelegt ist. Um auch größere Chargen an Nanosuspensionen herstellen zu können wurde der Niro Soavi Panda mit einem Probenvolumen von 120-600 ml auf seine Eignung getestet. Signifikante Unterschiede im hydrodynamischen Durchmesser konnten nicht festgestellt werden. Mit dem Avestin wurde eine Partikelgröße von ca. 95 nm und mit dem Niro Soavi von ca. 99 nm erreicht (Tabelle 8). Allerdings wurde mit dem Niro Soavi eine engere Partikelgrößenverteilung erreicht, was der PDI verdeutlicht. Diese Unterschiede im PDI sind allerdings marginal.

Tabelle 8: Eigenschaften der SLN30 nach der Herstellung mit zwei unterschiedlichen Homogenisatoren

Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 6 Experimenten \pm SEM.

Nanopartikelformulierung	Homogenisator	z-average [nm]	PDI
SLN30	Avestin Emulsiflex C5	95,62 \pm 1,37	0,155 \pm 0,007
SLN30	Niro Soavi Panda	99,23 \pm 1,45	0,105 \pm 0,010

4.3.6 Partikelcharakterisierung nach Resuspendierung des Aerosols

Um Informationen über die Partikelgröße der SLN30 nach Aerosolisierung zu erlangen, wurde das getrocknete Aerosol am Ende der Expositionskammer (Abb. 9) in einer 3-prozentigen Tensidlösung wieder aufgefangen und mit dem Zetasizer der hydrodynamische Durchmesser bestimmt.

Nach der Resuspendierung des Aerosols wurde eine signifikante Erhöhung des Partikeldurchmessers ermittelt (Tabelle 9). Der Polydispersitätsindex stieg auf ca. 0,45 an, was auf eine polydisperse Partikelgrößenverteilung hindeutet.

Tabelle 9: Eigenschaften der SLN30 nach Resuspendierung des SLN30-Aerosols in 3-prozentigem Solutol

Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 6 Experimenten \pm SEM. * $p < 0,0001$ gegen SLN30

Nanopartikelformulierung	z-average [nm]	PDI
SLN30	94,07 \pm 1,23	0,146 \pm 0,006
SLN30 resuspendiert	222,9 \pm 12,47 *	0,448 \pm 0,027*

4.4 Aufnahmeuntersuchungen der Nanosuspensionen mit verschiedenen Zellen und nach Aerosolisierung

In diesem Abschnitt wird erläutert, ob die SLN nach Aerosolisierung in Zellen aufgenommen werden. Diese Erkenntnis ist wichtig bei der Etablierung eines neuartigen Arzneistoffträgersystems. Um die Aufnahme der SLN in Zellen bzw. den Weg der Partikel nach Aerosolisierung nachvollziehen zu können, wurden die SLN mit sehr lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

4.4.1 Bestimmung der Inkorporierungseffizienz der Farbstoffe

Zur Beurteilung der Inkorporierungseffizienz der Farbstoffe in die SLN wurden die Nanosuspensionen mittels Vivaspin-Konzentratoren (MWCO 300.000 Da) einer Zwangsfiltration unterzogen. Das dabei generierte Filtrat (grün dargestellt) wurde anschließend photometrisch vermessen. Diese indirekte Methode zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität zeigte, dass ausschließlich die markierten Nanosuspensionen fluoreszierten und die Filtrate frei von jeglicher Fluoreszenzintensität waren (Abb. 36). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die stark lipophilen Farbstoffe größtenteils in die LM inkorporiert oder an diese adsorbiert sind.

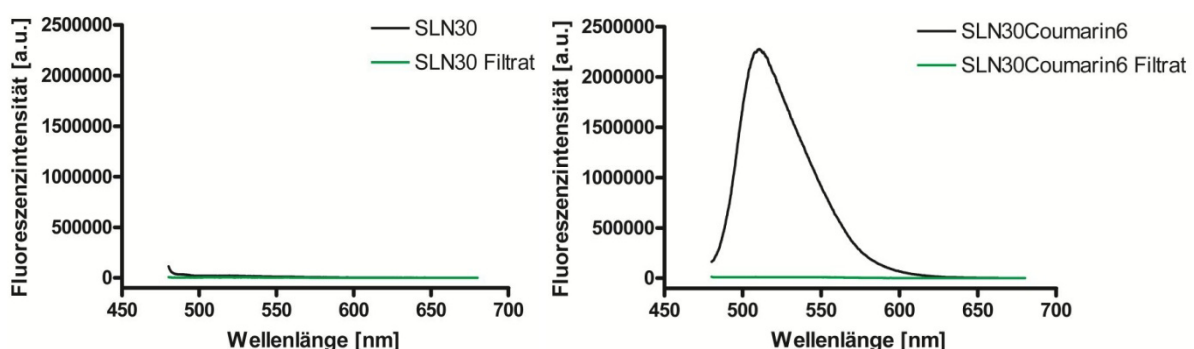


Abb. 36: A) Fluoreszenzintensität einer SLN30 Nanosuspension und deren Filtrat; B) Fluoreszenzintensität einer Coumarin6 markierten SLN30 Nanosuspension und deren Filtrat

4.4.2 Aufnahmeuntersuchungen der markierten SLN

Um zu überprüfen, ob die SLN als mögliches Arzneistoffträgersystem von Zellen aufgenommen werden, wurden verschiedene Aufnahmeuntersuchungen durchgeführt.

4.4.2.1 *In-vitro*-Untersuchungen mit Zelllinien

Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob Lungenzellen in der Lage sind, SLN aufzunehmen, wurden *In-vitro*-Tests mit humanen alveolären Epithelzellen (A549) und mit murinen Makrophagen (RAW 264.7) durchgeführt. Die Zellen wurden mit den markierten SLN für 6 h inkubiert und anschließend am konfokalen Mikroskop untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zur Kontrolle die Zellen fluoreszierten (Abb. 37). Um falsch positive Ergebnisse durch die natürliche Autofluoreszenz der Zellen zu umgehen, wurden A549- bzw. RAW 264.7-Zellen mit unmarkierten SLN inkubiert und als Kontrollen mitgeführt.

Bei genauerer Betrachtung lassen sich im Inneren der Zellen hellere aufleuchtende Punkte erkennen, die von Partikelagglomeraten stammen könnten.

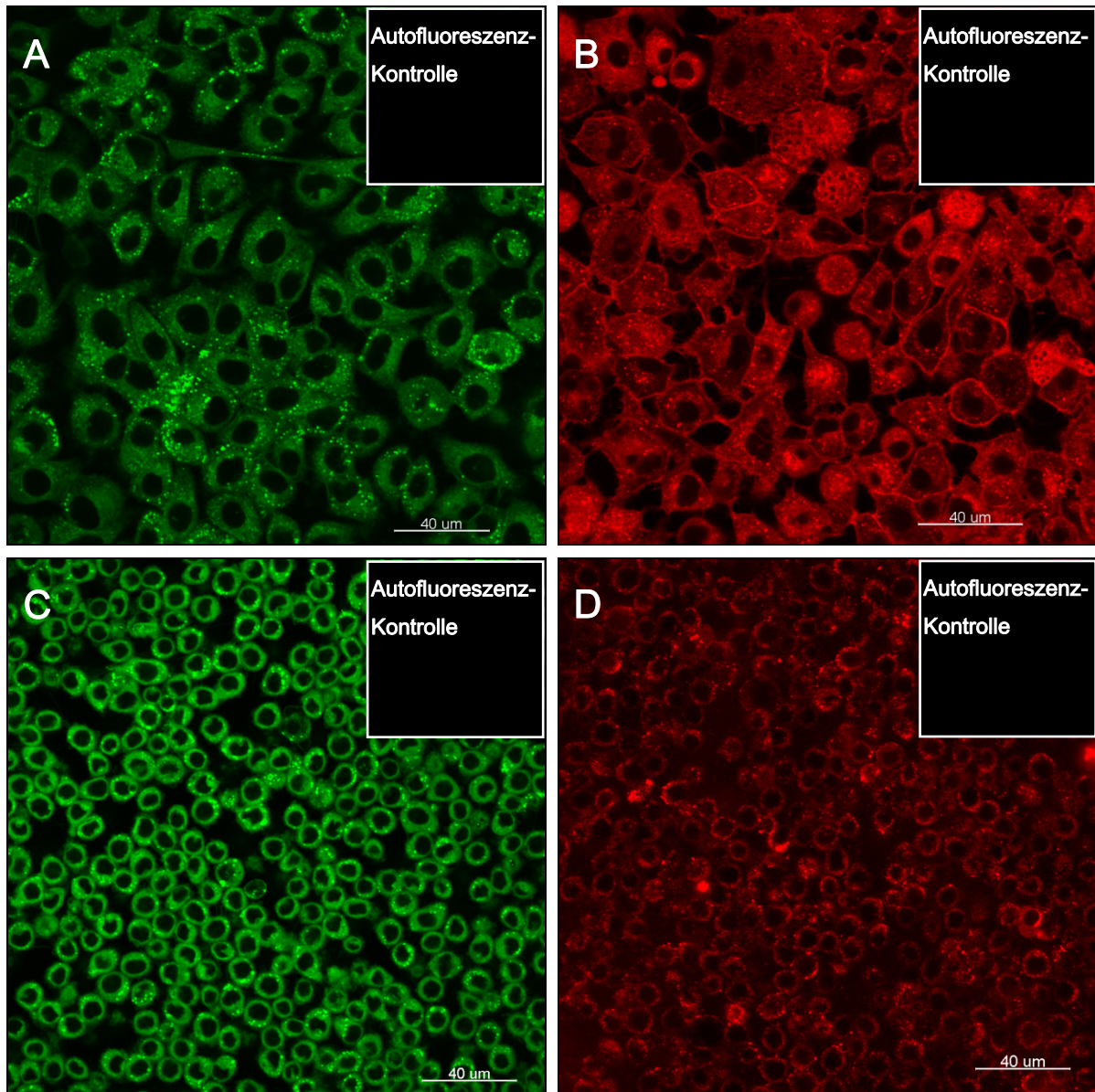


Abb. 37: Repräsentative Bilder von humanen alveolären Epithelzellen und murinen Makrophagen nach 6 h Inkubation mit markierten SLN

A) A549-Zellen nach Inkubation mit Coumarin-6-markierten SLN; B) A549-Zellen nach Inkubation mit Dil-markierten SLN; C) RAW-264.7-Zellen nach Inkubation mit Coumarin-6-markierten SLN; D) RAW-264.7-Zellen nach Inkubation mit Dil-markierten SLN

4.4.2.2 *In-vitro*-Untersuchungen mit Primärzellen

Um die Ergebnisse der Zelllinien mit denen von Primärzellen zu vergleichen, wurden weitere Versuche mit frisch isolierten murinen Makrophagen und dendritischen Zellen durchgeführt. Auch in diesem Versuchsaufbau wurden die Zellen 6 h mit den markierten SLN exponiert. Anschließend wurden das Zytoskelett (rot dargestellt) und der Zellkern (blau dargestellt) angefärbt. Die Auswertung mit dem konfokalen Mikroskop zeigte, dass Alveolarmakrophagen (Abb. 38) und dendritische Zellen (Abb. 39) in der Lage sind SLN aufzunehmen.

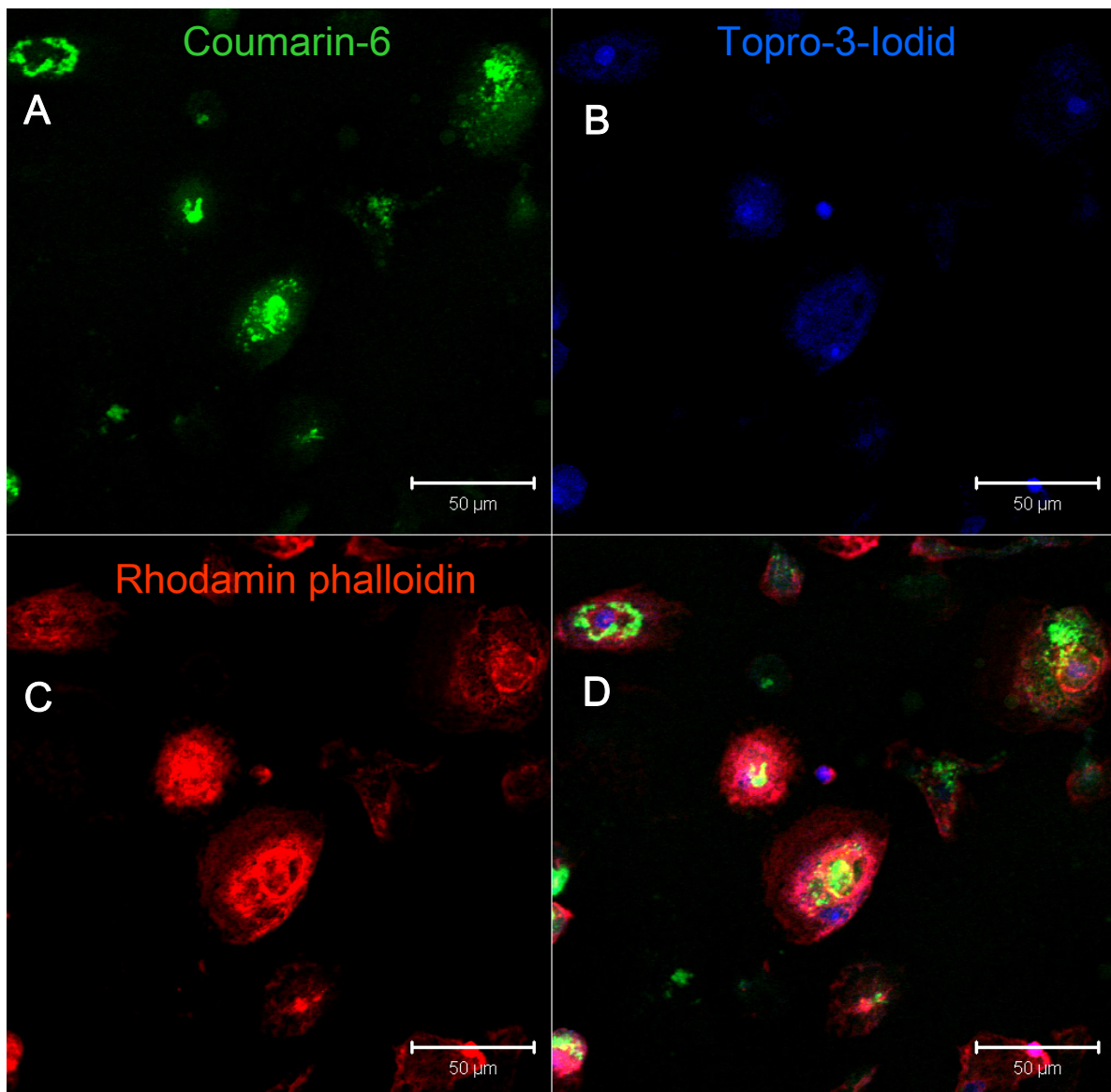


Abb. 38: Repräsentative Darstellung durch Alveolarmakrophagen aufgenommene SLN

Die Bilder zeigen die aufgespalteten Fluoreszenzkanäle einer konfokal-mikroskopischen Aufnahme. A) Coumarin-6-Nanopartikelagglomerate; B) Topro-3-Iodid-Färbung der Zellkerne, wobei etwas Farbstoff in das Zytosol gelangt ist; C) Rhodaminphalloidin-Färbung des Zytoskeletts (F-Aktin-Fasern); D) Überlagerung der 3 Fluoreszenzkanäle.

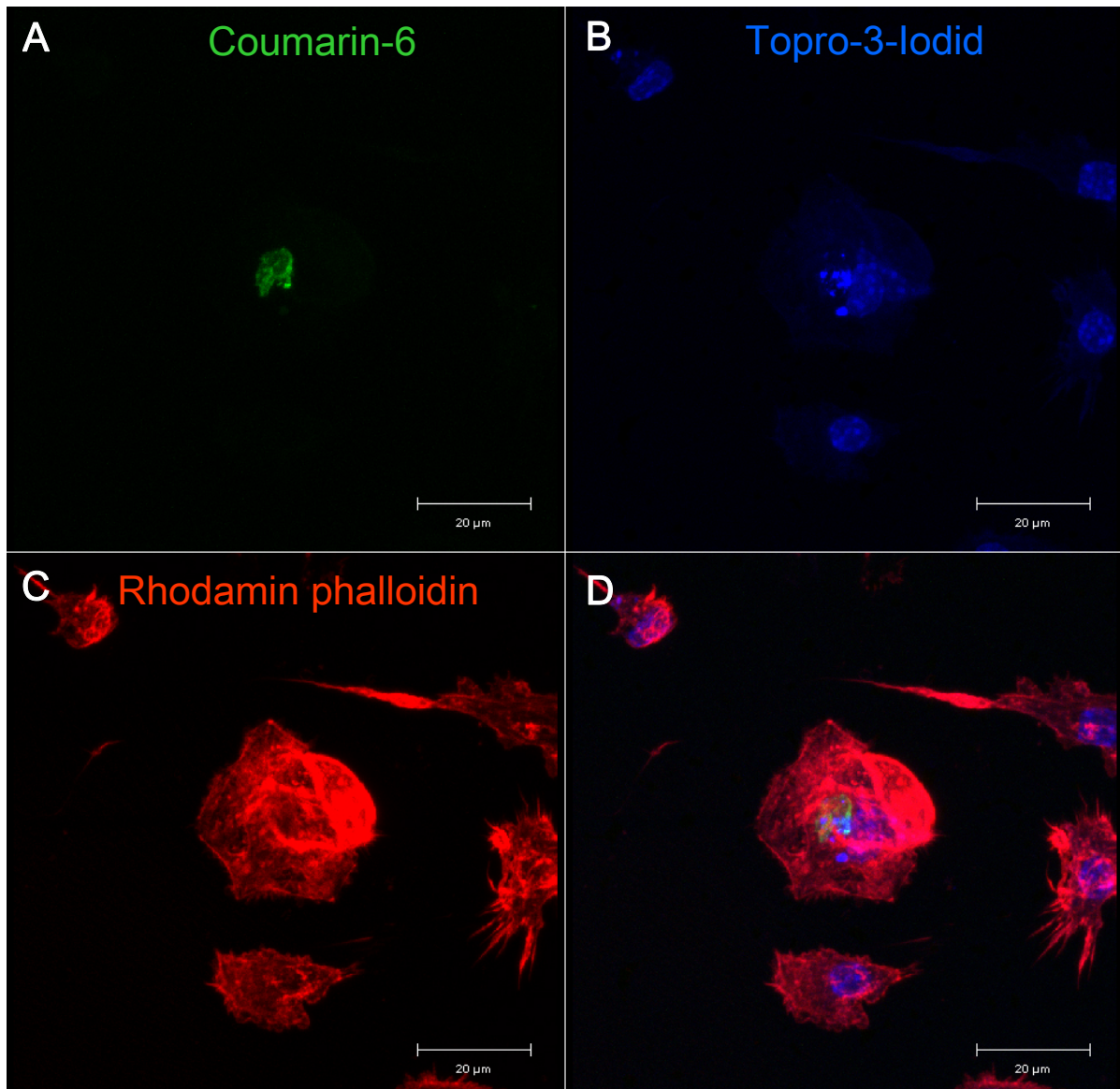


Abb. 39: Repräsentative Darstellung durch dendritische Zellen aufgenommene SLN.

Die Bilder zeigen die aufgespalteten Fluoreszenzkanäle einer konfokal-mikroskopischen Aufnahme. A) Coumarin-6-Nanopartikelagglomerate; B) Topro-3-Iodid-Färbung der Zellkerne, wobei etwas Farbstoff in das Zytosol gelangt ist; C) Rhodaminphalloidin Färbung des Zytoskeletts (F-Aktin-Fasern); D) Überlagerung der 3 Fluoreszenzkanäle.

Da aus den mikroskopischen Bildern nicht eindeutig hervorgeht, ob die Lipidnanopartikel intrazellulär vorliegen oder an die Zellmembran adsorbiert sind, wurde mittels der IMARIS[®]-Software eine 3D-Rekonstruktion der Aufnahmen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Bearbeitungssoftware konnte festgestellt werden, dass die SLN in die Zellen aufgenommen

wurden (Abb. 40). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Nanopartikelagglomerate vorzugsweise in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sind.

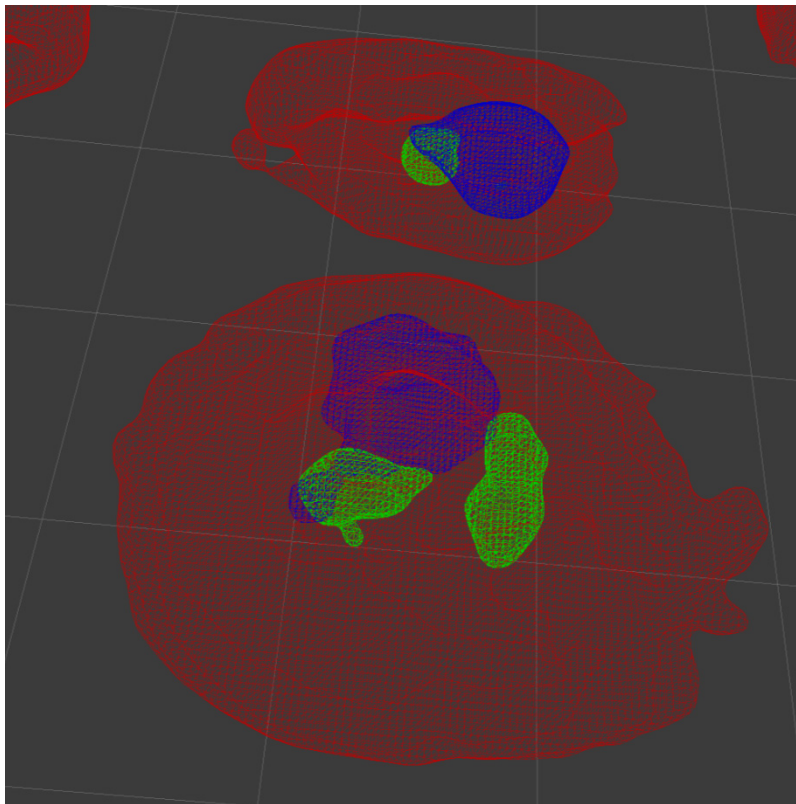


Abb. 40: 3D-Rekonstruktion eines repräsentativen Bildes, welches die SLN-Aufnahme in Alveolarmakrophagen zeigt

Das Bild wurde mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und mit der Software IMARIS ausgewertet. Rot dargestellt ist das Zytoskelett (F-Aktin-Fasern) der Zelle, welches mit Rhodaminphalloidin angefärbt wurde. In blau zu sehen ist der mit Topro-3-Iodid angefärbte Zellkern. Die grünen Strukturen sind die Coumarin-6-markierten Nanopartikelagglomerate. Die im Hintergrund dargestellten Quadrate haben eine Kantenlänge von 10 μm .

4.4.2.3 *In-vivo*-Untersuchungen mit isolierten Lymphknoten

Um die Funktionalität der SLN als mögliches Arzneistofftransportsystem zu überprüfen, wurden die markierten SLN Mäusen als Aerosol verabreicht. Da aus immunologischer Sicht die Lymphknoten eine interessante Zielstruktur darstellen, wurde überprüft, ob sich die aerosolisierten Lipidnanopartikel in den Lymphknoten wiederfinden lassen. 24 Stunden nach Gabe des SLN-Aerosols wurden die mediastinalen Lymphknoten der Versuchstiere entfernt und mit dem konfokalen Mikroskop auf Fluoreszenz der markierten SLN untersucht. Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, wurden SLN-positive Lymphozyten in den Lymphknoten gefunden.

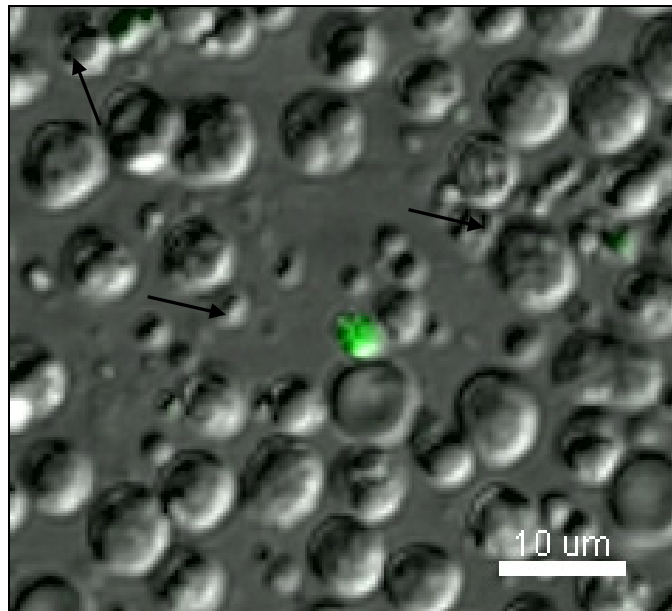


Abb. 41: Repräsentative Abbildung von Lymphozyten aus Lymphknoten, die SLN aufgenommen haben

Die Aufnahme wurde 24 Stunden nach Applikation des Aerosols mittels konfokaler Mikroskopie angefertigt. Grün dargestellt sind die Coumarin-6-Nanopartikelagglomerate. Das Bild zeigt die Überlagerung des Durchlichtkanals mit dem Fluoreszenzkanal für Coumarin-6.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von Lipidnanopartikeln als Arzneistoffträger für die pulmonale Applikation untersucht. Während im ersten Teil der Arbeit immun-toxikologischen Fragestellungen nachgegangen wurde, stand im mittleren Teil der Arbeit die chemisch-physikalische Charakterisierung im Vordergrund. Der letzte Teil beschäftigte sich mit der Partikelaufnahme in unterschiedliche Zellen der Lunge.

5.1 Charakterisierung des toxischen und inflammatorischen Potenzials der SLN

In den oben beschriebenen Experimenten konnte erstmalig für die Zusammensetzung der Lipidnanopartikel aus Sojalecithin (Phospholipon 90G) und Hartfett (Softisan 154) eine toxische Schwelle definiert werden.

Obwohl Aspekte der Toxizität von Lipidnanopartikeln seit mehr als 15 Jahren untersucht werden, ist es u.a. aufgrund von Unterschieden in der Zusammensetzung der SLN, Unterschieden der verwendeten Lipide und durch prozentuale Unterschiede der Lipide innerhalb der Lipidmatrix nicht möglich, die bisherigen Daten der Studien miteinander zu vergleichen [183-186]. Aufgrund der ungenügenden Datenlage in der Literatur zur Vergleichbarkeit des toxischen und inflammatorischen Potenzials von SLN, wurden in dieser Arbeit erst *in vitro*, dann *ex vivo* und abschließend *in vivo* toxikologische Studien durchgeführt. Bei der Entwicklung eines Arzneistoffträgersystems sind *In-vitro*-Studien vor *In-vivo*-Studien sehr nützlich. Sie sind wertvolle Hilfsmittel, um die Funktionalität der Arzneistoffe zu überprüfen und um präzisere Anfangskonzentrationen für Tierstudien vorherzusagen.

Um zu überprüfen, ob und wenn ja in welchem Ausmaß zytotoxische Reaktionen stattfinden, wurden in einem ersten Schritt verschiedene *In-vitro*-Vitalitäts- und -Zytotoxizitätsuntersuchungen an zellulären Systemen durchgeführt. Dafür wurden die humane Epithelzelllinie A549 und murine Präzisionslungenschnitte eingesetzt.

Die *In-vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit stehen in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe. In einer Vorarbeit von Martin Schubert wurde die Zytotoxizität verschiedener SLN an humanen Hautfibroblasten (HDF-Zellen) mittels NRT bestimmt [187]. Da in der erwähnten Arbeit eine dermale bzw. subkutane Applikation beabsichtigt war, wurden HDF-Zellen als Modell gewählt. Dabei zeigten die SLN30 nach 24 h Inkubation eine

LD₅₀ von circa 3885 µg/ml. Die von Schubert gefundene LD₅₀ war etwas größer als die von uns ermittelte EC₅₀, was an einer größeren Empfindlichkeit von Alveolarzellen gegenüber Fibroblasten liegt [188]. Die in der vorliegenden Arbeit und von Schubert *et al.* ermittelten Zytotoxizitäten sind vergleichsweise niedrig. Die Arbeitsgruppe um Yuan untersuchte den zytotoxischen Einfluss von SLN unterschiedlicher Lipidkomposition ebenfalls an A549-Zellen und fand IC₅₀-Werte zwischen 300 µg/ml und 500 µg/ml [189]. Eine mögliche Erklärung für die höheren Zytotoxizitäten bei Yuan könnte die Expositionsdauer sein. Den Ergebnissen dieser Arbeit liegt eine Expositionsdauer von 24 h zugrunde, während bei Yuan die A549-Zellen für 48 h den Nanosuspensionen ausgesetzt waren.

Eine Hochregulation des proinflammatorischen Zytokins IL-8 konnte während der Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von SLN30 nicht beobachtet werden, obwohl bekannt ist, dass A549 in der Lage sind, IL-8 zu produzieren und zu sezernieren, wenn diese mit anderen Nanopartikeln inkubiert werden [190-193]. Eine dosisabhängige Erhöhung der IL-8 Sekretion konnte zum Beispiel beobachtet werden, wenn A549-Zellen mit Carbon-Black-, Quarz- (DQ 12) oder Titandioxid-Nanopartikeln inkubiert wurden.

Um die respiratorische Toxizität der SLN näher zu untersuchen, wurde in einem zweiten Schritt ein *Ex-vivo*-Modell gewählt. Dieses Modell wurde verwendet, weil dort nahezu alle relevanten Zelltypen, wie zum Beispiel Epithelzellen, Endothelzellen, Basalzellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Lymphozyten und Fibroblasten, vorhanden sind. Ein weiterer Vorteil dieses gewebetypischen Zellverbandes ist, dass die Zell-Zell-Interaktionen erhalten sind [154]. Die Entscheidung fiel für dieses *Ex-vivo*-Lungenmodell, um der *In-vivo*-Situation näher zu kommen. Verglichen mit anderen Modellen erlaubt dieses *Ex-vivo*-Modell die Beurteilung des biochemischen und pathologischen Zusammenspiels von potenziell toxischen Stoffen, was nicht mit einfachen Zellkulturen möglich ist [194]. Das Vorhandensein von und die mögliche Interaktion zwischen dieser Vielfalt von Zellen stellt eine mögliche Erklärung für die geringeren EC₅₀-Werte dar. Ebenso könnte die etwas höhere Sensitivität des WST-1- gegenüber der des MTT-Testes dafür mit verantwortlich sein [195].

Da gezeigt werden konnte, dass PCLS auf verschiedene Stimuli wie LPS oder Carbon Black mit einer Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine ansprechen, wurden in diesem Versuchsaufbau KC und TNF-α gemessen [153, 196]. Chemokin KC, welches das murine Homologon zum humanen IL-8 darstellt, wird unter anderem von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen produziert [197-199]. Die Untersuchung des KC-Zytokinspiegels zeigte einen signifikanten Anstieg bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml (Abb. 17). Möglicherweise aufgrund von apoptotischen oder nekrotischen Prozessen in den Gewebeschnitten kam es bei höheren Konzentrationen von SLN zum Absinken der KC-Konzentration. Eine Vielzahl von Zellen wie zum Beispiel Granulozyten, Monozyten und

Mastzellen sind in der Lage, TNF- α zu sezernieren [198]. Eine besonders potente Quelle für TNF- α stellen jedoch Alveolarmakrophagen dar [200]. Die TNF- α -Spiegel in diesem Ex-vivo-Experiment blieben allerdings unverändert, sodass geschlussfolgert werden kann, dass die SLN kein TNF- α induzieren. In verschiedenen Studien wurde berichtet, dass Phosphatidylcholine ein Inhibitor von TNF- α sind und dadurch bestimmte Signalwege in der Entzündungskaskade unterdrücken können [201-204]. Da das verwendete Sojalecithin (Phospholipon 90 G) mindestens 94 % Phosphatidylcholin enthält, könnte dies eine Erklärung für die konstanten TNF- α -Spiegel sein. Durch die Inkubation der PCLS mit dem bakteriellen Endotoxin LPS wurde überprüft, ob die Lungenschnitte in der Lage sind auf bestimmte Reize zu reagieren. Die parallele Inkubation der PCLS mit LPS zeigte einen signifikanten Anstieg des TNF- α -Gehaltes (Abb. 19).

In einem abschließenden In-vivo-Versuch zur Ermittlung der respiratorischen Toxizität und des inflammatorischen Potenzials der Lipidnanopartikel wurden die Nanosuspensionen inhalativ an Mäuse verabreicht. In der Studie traten weder nach kurzfristiger noch nach längerfristiger Applikation der SLN zytotoxische Reaktionen im Lungengewebe auf. Darauf wiesen die unveränderten LDH-Spiegel und Gesamtproteinkonzentrationen in der BAL nach Lipidnanopartikel-Behandlung hin. Im Gegensatz dazu wurden bei der Positivkontrolle mit Carbon Black signifikant erhöhte LDH-Spiegel festgestellt. Die In-vivo-Daten belegen zusätzlich, dass in dem getesteten Konzentrationsbereich die Marker für eine Entzündung annähernd unverändert blieben - im Unterschied zur Positivkontrolle. Die als Positivkontrolle benutzten Carbon-Black-Nanopartikel können Entzündungen und Tumore in der Lunge induzieren [205, 206].

Publikationen bezüglich des toxischen Potenzials von Nanopartikeln sind sehr widersprüchlich, denn bis jetzt hat sich noch kein einheitlicher Endpunkt zur Charakterisierung durchgesetzt. Zurzeit werden die toxischen Effekte von Nanopartikeln anhand der Partikelanzahl, Partikelgröße, Partikelmasse, spezifischen Partikeloberfläche oder anhand der funktionellen Gruppen miteinander verglichen [207]. Ein Parameter, der sich unter Nanopartikeltoxikologen bei der Beurteilung von potenziellen toxischen Effekten immer weiter durchsetzt, ist der Vergleich der Nanopartikel in Bezug auf deren Oberfläche [208-211].

5.2 Aufnahme der SLN

Physikochemische Eigenschaften wie die Partikelgröße, Form und Gestalt, Molekulargewicht, Oberflächenladung (Zetapotenzial), Oberflächenbeschaffenheit (funktionelle Gruppen) und die Zusammensetzung der Partikel spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme von Nanopartikeln [212].

In den hier vorliegenden Experimenten konnte die Aufnahme und Adhäsion von SLN in und an humane alveoläre Epithelzellen gezeigt werden.

Der erste Teil der Aufnahmeversuche wurde mit den kommerziell erworbenen Zelllinien A549 und RAW 264.7 durchgeführt. In dieser Studie war deutlich erkennbar, dass die SLN von beiden Zelltypen internalisiert wurden und sich im Zytoplasma verteilten. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen publizierten Aufnahmeversuchen mit SLN, welche die Internalisierung in Leukozyten [213] und an Keratinozyten [212] studierten. In einem weiteren Versuch wurde die Internalisierung von SLN an frisch isolierten murinen Makrophagen und an murinen Knochenmarks-generierten dendritischen Zellen erforscht (Abb. 38 und 39). Dabei war deutlich erkennbar, dass die Lipidnanopartikel in die Zellen aufgenommen wurden und sich in der Nähe des Zellkerns konzentrierten. Diese Beobachtungen konnten durch 3D-Rekonstruktionen verifiziert werden (Abb. 40). Eine solche Anordnung der Nanopartikel in Zellkernnähe wurde auch von Nam und Kollegen bei Verwendung von Chitosannanopartikeln und von der Arbeitsgruppe um Wan bei Verwendung von PEG-modifizierten SLN beobachtet [214, 215]. Während Nam *et al.* die Aufnahme der Nanopartikel an der HeLa-Zelllinie untersuchte, studierte Wan *et al.* die Internalisierung an den RAW 264.7, MCF-7 und der A549-Zelllinie.

Die Aufnahme von Nanopartikeln ist sehr stark zeit- und dosisabhängig [214, 216]. Kristl und Kollegen zeigten, dass SLN (welche u. a. auch aus Phospholipon bestanden) innerhalb einer Minute die Zellmembran von Keratinozyten passierten und sich anschließend im Zytoplasma verteilten [212, 217, 218].

Die Ergebnisse einer Studie von Almeida *et al.* lassen darauf schließen, dass die zelluläre Internalisierung von SLN durch Schwachstellen in Lipid-Lipid-Wechselwirkungen beschrieben werden kann [219]. Diese Schwachstellen führen zu dynamischen, reversiblen Lipiddomänen in der Doppelschicht der biologischen Membranen. Die Arbeitsgruppe um Swanson fand heraus, dass die Aufnahme der Partikel sowohl von ihrer Morphologie als auch von ihrer Lokalisation auf der Zelloberfläche abhängig ist [220].

5.3 Arzneistoffbeladung

Während bei den Solubilisationsversuchen noch 2 % Dexamethason in die Lipidmatrix eingebaut werden konnten, war es bei der Herstellung der SLN nur noch 1 %. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Lokalisation des Arzneistoffes in den Lipidnanopartikeln. Dadurch, dass sich die Dexamethasonmoleküle wahrscheinlich interkalierend zwischen den Lecithinmolekülen aufhalten, werden diese bei Rekristallisation der LM in die höher geordnete und dadurch stabilere β -Modifikation aus der Grenzfläche herausgetrieben. Die Arzneistofflokalisation ist auf die chemische Struktur zurückzuführen. Dexamethason besteht aus einem Steroidgrundgerüst, das sich zwischen den lipophilen Fettsäureketten des Phospholipids positionieren kann. Das Glukokortikoid besitzt aber auch durch die drei Hydroxylgruppen und die zwei Ketogruppen polare Bereiche, die eine entsprechende Affinität zu den polaren Kopfgruppen des Lecithins aufweisen.

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte durch thermoanalytische Verfahren, röntgenanalytische Verfahren und IR-Messungen gezeigt werden, dass in Gegenwart von mindestens 10 % Phospholipiden in der LM eine beschleunigte Umlagerung der instabilen α - über β' - in die stabile β -Modifikation bei der Rekristallisation der Lipidnanopartikel stattfindet [221-223].

Die näherungsweise bestimmte Einschlusseffizienz des schwer wasserlöslichen Dexamethasons ist mit 99.97 % (bei 1 % Dexa in der LM) sehr hoch, weswegen diese Nanosuspensionen für diesen Arzneistoff und ähnlich geartete ein geeignetes Arzneistoffträgersystem darstellen. Obwohl die Bestimmung der Einschlusseffizienz häufig angewendet wird, oft mittels Vivaspin-Konzentratoren, stellt diese Variable meist eine nicht genau ermittelbare Größe dar [224-226]. Denn es kann nicht immer mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der nichtinkorporierte oder –adsorbierte Arzneistoff vollständig die Poren des Filters passiert hat und sich im Filtrat befindet.

Die verschiedensten Arzneistoffe (inklusive Proteine) wurden bereits an SLN adsorbiert beziehungsweise inkorporiert, wie zum Beispiel: Diazepam, Insulin, Ciclosporin, Gatifloxacin, Paclitaxel, Interferon- α und siRNA [109, 110, 120, 122, 183, 227-232], wobei die Beladungskapazitäten zwischen 20 und 97 % liegen. Die meisten SLN-Arzneistoffkombinationen wurden für den parenteralen oder transdermalen Applikationsweg entwickelt sowie für die gezielte Pharmakotherapie des Auges oder des Gehirns. Nur sehr wenige Forschergruppen beschäftigen sich mit der Pharmakotherapie der Lunge und der inhalativen Gabe von SLN als innovatives, neuartiges Arzneistoffträgersystem. Andere Autoren berichten von einem Vernebeln der SLN-Dispersionen ohne signifikante Veränderungen der mittleren Teilchengröße [83]. Diese Aussage stimmt mit unseren Befunden nicht überein,

denn die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen signifikanten Anstieg des hydrodynamischen Partikeldurchmessers von 95 nm auf 220 nm nach Aerosolisierung der SLN-Dispersionen. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Befunde könnte das Verneblersystem sein, welches in der genannten Literaturstelle nicht näher beschrieben wird.

Um das Breitspektrum-Antimykotikum Itraconazol in die Lunge zu bringen, wendeten Yang *et al.* folgende Methode an [125, 233]: Sie stellten eine Mischung aus Arzneistoff, Mannitol und Lecithin her, welche lyophilisiert wurde. Dieses Pulver wurde in gereinigtem Wasser gelöst. Die dadurch entstandenen Itraconazol-Nanopartikeldispersionen wurden anschließend mit einem Ultraschallvernebler (Aeroneb® Professional) Mäusen inhalativ verabreicht. Die Nanopartikel lagen in einem Größenbereich zwischen 230 und 540 nm. Der von Yang *et al.* ermittelte MMAD von 2,38 µm liegt in demselben Größenbereich wie der in dieser Arbeit gemessene MMAD von 2,26 µm. Im Vergleich zu dieser Arbeit (GSD = 1,3) ermittelte die Arbeitsgruppe um Yang eine GSD von 2,6, was für polydisperse Aerosoltröpfchengrößen spricht.

Liu *et al.* stellten Insulin-beladene SLN mit Hilfe der invers doppelt-mizellaren Emulsionstechnik her [109]. Dabei entstanden gemischte Mizellen, sogenannte „mixed micelles“ [230]. Die LM bestand aus Stearinsäure, Palmitinsäure und dem Phospholipid Phosphatidylcholin. Um die Insulin-beladenen SLN an Ratten zu vernebeln, wurde ein Luftzerstäuber von PariBoy® verwendet. Der MMAD betrug 4,1 µm, was nicht optimal ist; denn der Partikeldurchmesser sollte nicht größer als 3 µm sein, wenn man den bronchoalveolären Bereich bei Ratten anvisiert hat [177]. Eine GSD als Maß für die Streuung der Partikelgrößen wurde nicht ermittelt.

Eine weitere Arbeitsgruppe, die sich mit der pulmonalen Bereitstellung von SLN als Arzneistoffträgersystem beschäftigt, ist die Gruppe um Chattopadhyay. Sie aerosolisiert die SLN mittels des AERx®-Systems, wobei ein MMAD von 2,6 µm und eine GSD von 1,3 erreicht werden [234]. Diese beiden Aerosolcharakteristika liegen in demselben Bereich wie die in dieser Arbeit ermittelten Werte (MMAD = 2,26 µm; GSD = 1,3). Die SLN wurden mit der Methode der überkritischen-flüssigen Extraktion von Emulsionen (SFEE, *supercritical fluid extraction of emulsions*) hergestellt. Dabei wurden Partikelgrößen kleiner als 50 nm erzeugt. Die LM wurde aus Glycerintripalmitat und Phospholipiden hergestellt.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Nanosuspensionen (SLN), bestehend aus einem natürlichen Triglyceridgemisch (S154) und Sojalecithin (P90G), auf ihr inflammatorisches und toxikologisches Potenzial untersucht. Diese Evaluierung wurde anhand von drei verschiedenen Modellen (*In-vitro*, *Ex-vivo* und *In-vivo*) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Nanosuspensionen bei pulmonaler Applikation bis zu einer deponierten Dosis von 200 µg toxikologisch unbedenklich sind.

Nachdem die toxische Schwelle der SLN als potenzielles Arzneistoffträgersystem ermittelt worden war, konnte in einem nächsten Schritt der Modellarzneistoff Dexamethason in die SLN inkorporiert werden. Durch physikochemische Untersuchungen wurde festgestellt, dass für die SLN bei 1 % Arzneistoffeinarbeitung eine Einschlusseffizienz von annähernd 100 % vorliegt. Nach Inkorporierung von Dexamethason stieg die Partikelgröße leicht an, während sich das Zetapotenzial nur unwesentlich veränderte.

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden Aufnahmeuntersuchungen von SLN an verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Damit die SLN in den Zellen identifiziert werden konnten, wurden sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Partikelgröße und das Zetapotenzial änderten sich nach Beladung der SLN mit den Farbstoffen nur marginal. Es konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel von Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen wurden und sich in der Nähe des Zellkerns anreicherten. In einem abschließenden Versuch wurden die fluoreszenzmarkierten SLN als Aerosol an Mäuse verabreicht. Dabei zeigte die Untersuchung der Lymphknoten, dass SLN-positive Lymphozyten nachweisbar waren.

Feste Lipidnanopartikel sind für den Einsatz als Arzneistoffträgersystem sehr viel versprechend, da sie eine hohe toxische Schwelle besitzen und die Möglichkeit beinhalten, Wirkstoffe zu adsorbieren bzw. zu inkorporieren. Zudem können die Nanosuspensionen mittels γ -Strahlen sterilisiert werden. Sie bieten weiterhin die Option für immunologische Vakzinierungsstrategien, da mit ihnen bei inhalativer Applikation die lokalen Lymphknoten erreicht werden, wo dann eine potenzielle Immunreaktion stattfinden könnte.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Orfanos, S. E., D. Langleben, J. Khoury, R. D. Schlesinger, L. Dragatakis, C. Roussos, J. W. Ryan, and J. D. Catravas. 1999. Pulmonary capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in humans. *Circulation* 99:1593-1599.
2. Bertelsmann Gesundheitslexikon.
3. Coxson, H. O., R. M. Rogers, K. P. Whittall, Y. D'Yachkova, P. D. Pare, F. C. Sciruba, and J. C. Hogg. 1999. A quantification of the lung surface area in emphysema using computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 159:851-856.
4. Scarpelli, E. M. 2003. Physiology of the alveolar surface network. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 135:39-104.
5. Hyde, D. M., Q. Hamid, and C. G. Irvin. 2009. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol* 124:S72-77.
6. di Prampero, P. E. 2003. Factors limiting maximal performance in humans. *Eur J Appl Physiol* 90:420-429.
7. Yaegashi, H., and T. Takahashi. 1994. The airway dimension in ordinary human lungs. A standardized morphometry of lung sections. *Arch Pathol Lab Med* 118:969-974.
8. Prisk, G. K., J. M. Fine, T. K. Cooper, and J. B. West. 2006. Vital capacity, respiratory muscle strength, and pulmonary gas exchange during long-duration exposure to microgravity. *J Appl Physiol* 101:439-447.
9. Hoffman, H. E., J. C. Gaylord, J. W. Blasecki, L. M. Shalaby, and C. C. Whitney, Jr. 1988. Pharmacokinetics and metabolism of rimantadine hydrochloride in mice and dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1699-1704.
10. Irvin, C. G., and J. H. Bates. 2003. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res* 4:4.
11. Hamelmann, E., J. Schwarze, K. Takeda, A. Oshiba, G. L. Larsen, C. G. Irvin, and E. W. Gelfand. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156:766-775.
12. Bodewes, R., G. F. Rimmelzwaan, and A. D. Osterhaus. 2010. Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 9:59-72.

13. Videira, M. A., L. Gano, C. Santos, M. Neves, and A. J. Almeida. 2006. Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration. *J Microencapsul* 23:855-862.
14. Patton, J. S. 1996. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 19:3-36.
15. Bailey, M. M., and C. J. Berkland. 2009. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Med Res Rev* 29:196-212.
16. Videira, M. A., M. F. Botelho, A. C. Santos, L. F. Gouveia, J. J. de Lima, and A. J. Almeida. 2002. Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles. *J Drug Target* 10:607-613.
17. Shen, Z. C., Q. Zhang, S. L. Wei, and T. Nagai. 1999. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *International Journal of Pharmaceutics* 192:115-121.
18. Byron, P. R., and J. S. Patton. 1994. Drug delivery via the respiratory tract. *J Aerosol Med* 7:49-75.
19. Patton, J. S., and R. M. Platz. 1992. Routes of delivery: Case studies: (2) Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Advanced Drug Delivery Reviews* 8:179-196.
20. Ji, C. M., W. V. Cardoso, A. Gebremichael, R. M. Philpot, A. R. Buckpitt, C. G. Plopper, and K. E. Pinkerton. 1995. Pulmonary cytochrome P-450 monooxygenase system and Clara cell differentiation in rats. *Am J Physiol* 269:L394-402.
21. Tronde, A., B. Norden, H. Marchner, A. K. Wendel, H. Lennernas, and U. H. Bengtsson. 2003. Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. *J Pharm Sci* 92:1216-1233.
22. Hung, O. R., S. C. Whynot, J. R. Varvel, S. L. Shafer, and M. Mezei. 1995. Pharmacokinetics of inhaled liposome-encapsulated fentanyl. *Anesthesiology* 83:277-284.
23. Masood, A. R., and S. H. Thomas. 1996. Systemic absorption of nebulized morphine compared with oral morphine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 41:250-252.
24. Tan, S., O. Hung, S. Whynot, and M. Mezei. 1996. Sustained tissue drug concentrations following inhalation of liposome-encapsulated fentanyl in rabbits *Drug Delivery* 3:251-254.
25. WHO. May 2008. Asthma. WHO Media Centre.
26. Renz, H., N. Blumer, S. Virna, S. Sel, and H. Garn. 2006. The immunological basis of the hygiene hypothesis. *Chem Immunol Allergy* 91:30-48.

27. Duan, Q. L., and K. G. Tantisira. 2009. Pharmacogenetics of asthma therapy. *Curr Pharm Des* 15:3742-3753.
28. Barnes, P. J. 2006. Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol* 533:2-14.
29. Allen, D. B. 2002. Safety of inhaled corticosteroids in children. *Pediatr Pulmonol* 33:208-220.
30. Kankaanranta, H., A. Lahdensuo, E. Moilanen, and P. J. Barnes. 2004. Add-on therapy options in asthma not adequately controlled by inhaled corticosteroids: a comprehensive review. *Respir Res* 5:17.
31. Milgrom, H., R. B. Fick, Jr., J. Q. Su, J. D. Reimann, R. K. Bush, M. L. Watrous, and W. J. Metzger. 1999. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N Engl J Med* 341:1966-1973.
32. Gold, P. M. 2009. The 2007 GOLD Guidelines: a comprehensive care framework. *Respir Care* 54:1040-1049.
33. Rabe, K. F., S. Hurd, A. Anzueto, P. J. Barnes, S. A. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. van Weel, and J. Zielinski. 2007. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176:532-555.
34. Rothe, T. 2009. [COPD--Update 2009]. *Praxis (Bern 1994)* 98:1343-1351; quiz 1348, 1351.
35. Price, D., A. Sharma, and F. Cerasoli. 2009. Biochemical properties, pharmacokinetics and pharmacological response of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:417-424.
36. Singanayagam, A., J. D. Chalmers, and A. T. Hill. 2009. Severity assessment in community-acquired pneumonia: a review. *QJM* 102:379-388.
37. Telenga, E. D., H. A. Kerstjens, D. S. Postma, N. H. Ten Hacken, and M. van den Berge. Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Expert Opin Pharmacother* 11:405-421.
38. Vectura. 2010. VR496 for cystic fibrosis and COPD.
39. Amirav, I., M. Cohen-Cymberknoh, D. Shoseyov, and E. Kerem. 2009. Primary ciliary dyskinesia: prospects for new therapies, building on the experience in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 10:58-62.
40. Jones, A. P., and C. Wallis. 2010. Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD001127.
41. Geller, D. E., M. W. Konstan, J. Smith, S. B. Noonberg, and C. Conrad. 2007. Novel tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis subjects: pharmacokinetics and safety. *Pediatr Pulmonol* 42:307-313.

42. Chuchalin, A., E. Amelina, and F. Bianco. 2009. Tobramycin for inhalation in cystic fibrosis: Beyond respiratory improvements. *Pulm Pharmacol Ther* 22:526-532.
43. Falagas, M. E., Siempos, II, P. I. Rafailidis, I. P. Korbila, E. Ioannidou, and A. Michalopoulos. 2009. Inhaled colistin as monotherapy for multidrug-resistant gram (-) nosocomial pneumonia: a case series. *Respir Med* 103:707-713.
44. Groll, A. H., J. Ritter, and F. M. Muller. 2001. Guidelines for Prevention of Pneumocystis carinii Pneumonitis in Children and Adolescents with Cancer. *Klin Padiatr* 213 Suppl 1:A38-49.
45. Kimura, M., S. Tanaka, A. Ishikawa, H. Endo, S. Hirohata, and H. Kondo. 2008. Comparison of trimethoprim-sulfamethoxazole and aerosolized pentamidine for primary prophylaxis of Pneumocystis jiroveci pneumonia in immunocompromised patients with connective tissue disease. *Rheumatol Int* 28:673-676.
46. Shah, S. P., and A. Misra. 2004. Development of liposomal amphotericin B dry powder inhaler formulation. *Drug Deliv* 11:247-253.
47. Otterson, G. A., M. A. Villalona-Calero, S. Sharma, M. G. Kris, A. Imondi, M. Gerber, D. A. White, M. J. Ratain, J. H. Schiller, A. Sandler, M. Kraut, S. Mani, and J. R. Murren. 2007. Phase I study of inhaled Doxorubicin for patients with metastatic tumors to the lungs. *Clin Cancer Res* 13:1246-1252.
48. Diaz, D., L. Chara, J. Chevarria, J. Carballido, E. Esteban, V. Navas, J. Monserrat, A. Prieto, A. de la Hera, and M. Alvarez-Mon. 2009. Inhaled IL-2 induces systemic immunomodulation in patients with renal cell carcinoma and lung metastasis. *Cancer Immunol Immunother* 58:235-245.
49. Gautam, A., and N. Koshkina. 2003. Paclitaxel (taxol) and taxoid derivatives for lung cancer treatment: potential for aerosol delivery. *Curr Cancer Drug Targets* 3:287-296.
50. Wattenberg, L. W., T. S. Wiedmann, and R. D. Estensen. 2004. Chemoprevention of cancer of the upper respiratory tract of the Syrian golden hamster by aerosol administration of difluoromethylornithine and 5-fluorouracil. *Cancer Res* 64:2347-2349.
51. Bellanti, J. A. 2006. Immunization update and hot topics in clinical immunology: how does this relate to my practice? *Allergy Asthma Proc* 27:456-464.
52. Diaz-Ortega, J. L., J. V. Bennett, D. Castaneda, J. R. Vieyra, J. L. Valdespino-Gomez, and J. F. de Castro. Successful seroresponses to measles and rubella following aerosolized Triviraten vaccine, but poor response to aerosolized mumps (Rubini) component: comparisons with injected MMR. *Vaccine* 28:692-698.
53. Bivas-Benita, M., M. Y. Lin, S. M. Bal, K. E. van Meijgaarden, K. L. Franken, A. H. Friggen, H. E. Junginger, G. Borchard, M. R. Klein, and T. H. Ottenhoff. 2009. Pulmonary delivery of DNA encoding Mycobacterium tuberculosis latency antigen

- Rv1733c associated to PLGA-PEI nanoparticles enhances T cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice. *Vaccine* 27:4010-4017.
54. Hung, O. R., S. C. Whynot, J. R. Varvel, S. L. Shafer, and M. Mezei. 1995. Pharmacokinetics of inhaled liposome-encapsulated fentanyl. *Anesthesiology* 83:277-284.
55. Martin, B. R., and J. L. Wiley. 2004. Mechanism of action of cannabinoids: how it may lead to treatment of cachexia, emesis, and pain. *J Support Oncol* 2:305-314; discussion 314-306.
56. File, E., and C. Deal. 2009. Clinical update on teriparatide. *Curr Rheumatol Rep* 11:169-176.
57. Davison, S., J. Thippawong, J. Blanchard, K. Liu, R. Morishige, I. Gonda, J. Okikawa, J. Adams, A. Evans, B. Otulana, and S. Davis. 2005. Pharmacokinetics and acute safety of inhaled testosterone in postmenopausal women. *J Clin Pharmacol* 45:177-184.
58. Alasaarela, E., and N. S. Oliver. 2009. Wireless solutions for managing diabetes: A review and future prospects. *Technol Health Care* 17:353-367.
59. Houlden, R., S. Ross, S. Harris, J. F. Yale, L. Sauriol, and H. C. Gerstein. 2007. Treatment satisfaction and quality of life using an early insulinization strategy with insulin glargine compared to an adjusted oral therapy in the management of Type 2 diabetes: the Canadian INSIGHT Study. *Diabetes Res Clin Pract* 78:254-258.
60. Gonzalez, C., D. Kanevsky, R. De Marco, G. Di Girolamo, and S. Santoro. 2006. Non-invasive routes for insulin administration: current state and perspectives. *Expert Opin Drug Deliv* 3:763-770.
61. Cefalu, W. T., J. S. Skyler, I. A. Kourides, W. H. Landschulz, C. C. Balagtas, S. Cheng, and R. A. Gelfand. 2001. Inhaled human insulin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 134:203-207.
62. Cefalu, W. T. 2001. Inhaled insulin: a proof-of-concept study. *Ann Intern Med* 134:795.
63. Gerber, R. A., J. C. Cappelleri, I. A. Kourides, and R. A. Gelfand. 2001. Treatment satisfaction with inhaled insulin in patients with type 1 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 24:1556-1559.
64. Heinemann, L. 2008. The failure of exubera: are we beating a dead horse? *J Diabetes Sci Technol* 2:518-529.
65. Black, C., E. Cummins, P. Royle, S. Philip, and N. Waugh. 2007. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of inhaled insulin in diabetes mellitus: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 11:1-126.

66. Fountaine, R., A. Milton, T. Checchio, G. Wei, M. Stolar, J. Teeter, R. Jaeger, and D. Fryburg. 2008. Acute passive cigarette smoke exposure and inhaled human insulin (Exubera) pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 65:864-870.
67. Neumiller, J. J., and R. K. Campbell. 2010. Technosphere insulin: an inhaled prandial insulin product. *BioDrugs* 24:165-172.
68. Smutney, C. C., E. M. Friedman, J. M. Polidoro, and N. Amin. 2009. Inspiratory efforts achieved in use of the Technosphere insulin inhalation system. *J Diabetes Sci Technol* 3:1175-1182.
69. Ugwoke, M. I., I. J. Vereyken, and H. Luessen. 2007. *Microparticles and Liposomes as Pulmonary Drug Delivery Systems: What are the Recent Trends?*
70. Taylor, K. M., and J. M. Newton. 1992. Liposomes for controlled delivery of drugs to the lung. *Thorax* 47:257-259.
71. Justo, O. R., and A. M. Moraes. 2003. Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation. *Drug Deliv* 10:201-207.
72. Glavas-Dodov, M., E. Fredro-Kumbaradzi, K. Goracinova, S. Calis, M. Simonoska, and A. A. Hincal. 2003. 5-Fluorouracil in topical liposome gels for anticancer treatment--formulation and evaluation. *Acta Pharm* 53:241-250.
73. Letsou, G. V., H. J. Safi, M. J. Reardon, M. Ergenoglu, Z. Li, C. N. Klonaris, J. C. Baldwin, B. E. Gilbert, and J. C. Waldrep. 1999. Pharmacokinetics of liposomal aerosolized cyclosporine A for pulmonary immunosuppression. *Ann Thorac.Surg.* 68:2044-2048.
74. Behr, J., G. Zimmermann, R. Baumgartner, H. Leuchte, C. Neurohr, P. Brand, C. Herpich, K. Sommerer, J. Seitz, G. Menges, S. Tillmanns, and M. Keller. 2009. Lung deposition of a liposomal cyclosporine A inhalation solution in patients after lung transplantation. *J Aerosol Med Pulm.Drug Deliv.* 22:121-130.
75. Suntres, Z. E., and P. N. Shek. 1998. Liposomes promote pulmonary glucocorticoid delivery. *J Drug Target* 6:175-182.
76. Bhardwaj, U., and D. J. Burgess. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. *Int J Pharm.*
77. Schiffelers, R. M., G. Storm, and I. A. Bakker-Woudenberg. 2001. Therapeutic efficacy of liposomal gentamicin in clinically relevant rat models. *Int J Pharm* 214:103-105.
78. Halwani, M., B. Yebio, Z. E. Suntres, M. Alipour, A. O. Azghani, and A. Omri. 2008. Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob.Chemother* 62:1291-1297.

79. Koshkina, N. V., V. Knight, B. E. Gilbert, E. Golunski, L. Roberts, and J. C. Waldrep. 2001. Improved respiratory delivery of the anticancer drugs, camptothecin and paclitaxel, with 5% CO₂-enriched air: pharmacokinetic studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 47:451-456.
80. Latimer, P., M. Menchaca, R. M. Snyder, W. Yu, B. E. Gilbert, B. G. Sanders, and K. Kline. 2009. Aerosol delivery of liposomal formulated paclitaxel and vitamin E analog reduces murine mammary tumor burden and metastases. *Exp Biol Med (Maywood.)* 234:1244-1252.
81. Khanna, C., P. M. Anderson, D. E. Hasz, E. Katsanis, M. Neville, and J. S. Klausner. 1997. Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer* 79:1409-1421.
82. Chono, S., R. Fukuchi, T. Seki, and K. Morimoto. 2009. Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary insulin delivery. *J Control Release* 137:104-109.
83. Courier, H. M., N. Butz, and T. F. Vandamme. 2002. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 19:425-498.
84. Beaulac, C., S. Clement-Major, J. Hawari, and J. Lagace. 1997. In vitro kinetics of drug release and pulmonary retention of microencapsulated antibiotic in liposomal formulations in relation to the lipid composition. *J Microencapsul.* 14:335-348.
85. Joshi, M., and A. Misra. 2001. Dry powder inhalation of liposomal Ketotifen fumarate: formulation and characterization. *Int J Pharm* 223:15-27.
86. Huynh, N. T., C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit. 2009. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 379:201-209.
87. El Baseir, M. M., and I. W. Kellaway. 1998. Poly(L-lactic acid) microspheres for pulmonary drug delivery: release kinetics and aerosolization studies. *International Journal of Pharmaceutics* 175:135-145.
88. Kawashima, Y., H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino, and T. Niwa. 1998. Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm.* 45:41-48.
89. Wichert, B., and P. Rohdewald. 1993. Low molecular weight PLA: a suitable polymer for pulmonary administered microparticles? *J Microencapsul.* 10:195-207.
90. Ishihara, T., T. Kubota, T. Choi, M. Takahashi, E. Ayano, H. Kanazawa, and M. Higaki. 2009. Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *Int J Pharm* 375:148-154.
91. Suarez, S., P. O'Hara, M. Kazantseva, C. E. Newcomer, R. Hopfer, D. N. McMurray, and A. J. Hickey. 2001. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the

- treatment of tuberculosis: screening in an infectious disease model. *Pharm Res* 18:1315-1319.
92. Sung, J. C., D. J. Padilla, L. Garcia-Contreras, J. L. Verberkmoes, D. Durbin, C. A. Peloquin, K. J. Elbert, A. J. Hickey, and D. A. Edwards. 2009. Formulation and pharmacokinetics of self-assembled rifampicin nanoparticle systems for pulmonary delivery. *Pharm Res* 26:1847-1855.
 93. Schneider, T., H. Zhao, J. K. Jackson, G. H. Chapman, J. Dykes, and U. O. Hafeli. 2008. Use of hydrodynamic flow focusing for the generation of biodegradable camptothecin-loaded polymer microspheres. *J Pharm Sci* 97:4943-4954.
 94. Kalaria, D. R., G. Sharma, V. Beniwal, and M. N. Ravi Kumar. 2009. Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: in vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. *Pharm Res* 26:492-501.
 95. Muller, R. H., K. Mader, and S. Gohla. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 50:161-177.
 96. Densmore, C. L., F. M. Orson, B. Xu, B. M. Kinsey, J. C. Waldrep, P. Hua, B. Bhogal, and V. Knight. 2000. Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol Ther* 1:180-188.
 97. Bray, M., M. Martinez, D. Kefauver, M. West, and C. Roy. 2002. Treatment of aerosolized cowpox virus infection in mice with aerosolized cidofovir. *Antiviral Res* 54:129-142.
 98. Farr, S. J., A. McElduff, L. E. Mather, J. Okikawa, M. E. Ward, I. Gonda, V. Licko, and R. M. Rubsamen. 2000. Pulmonary insulin administration using the AERx system: physiological and physicochemical factors influencing insulin effectiveness in healthy fasting subjects. *Diabetes Technol. Ther* 2:185-197.
 99. Cox, C. A., A. B. Cullen, M. R. Wolfson, and T. H. Shaffer. 2001. Intratracheal administration of perfluorochemical-gentamicin suspension: a comparison to intravenous administration in normal and injured lungs. *Pediatr Pulmonol.* 32:142-151.
 100. Wolfson, M. R., J. S. Greenspan, and T. H. Shaffer. 1996. Pulmonary administration of vasoactive substances by perfluorochemical ventilation. *Pediatrics* 97:449-455.
 101. Kimless-Garber, D. B., M. R. Wolfson, C. Carlsson, and T. H. Shaffer. 1997. Halothane administration during liquid ventilation. *Respir Med* 91:255-262.
 102. Taljanski, W., S. G. Pierzynowski, P. D. Lundin, B. R. Westrom, S. Eirefelt, J. Podlesny, M. Dahlback, H. Siwinska-Golebiowska, and B. W. Karlsson. 1997. Pulmonary delivery of intratracheally instilled and aerosolized cyclosporine A to young and adult rats. *Drug Metab Dispos* 25:917-920.

103. Kontoyianni, C., Z. Sideratou, T. Theodossiou, L. A. Tziveleka, D. Tsiourvas, and C. M. Paleos. 2008. A novel micellar PEGylated hyperbranched polyester as a prospective drug delivery system for paclitaxel. *Macromol.Biosci.* 8:871-881.
104. Lawrence, M. J., and G. D. Rees. 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv.Drug Deliv.Rev* 45:89-121.
105. Rogerio, A. P., C. L. Dora, E. L. Andrade, J. S. Chaves, L. F. Silva, E. Lemos-Senna, and J. B. Calixto. 2009. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res.*
106. Gasco, M. R. 1993. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. USA.
107. Müller, R. H. 1996. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen (feste Lipidnanosphären (SLN)). In *Europäische Patentschrift*.
108. Hu, F. Q., Y. Hong, and H. Yuan. 2004. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int J Pharm* 273:29-35.
109. Liu, J., T. Gong, H. Fu, C. Wang, X. Wang, Q. Chen, Q. Zhang, Q. He, and Z. Zhang. 2008. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int J Pharm.*
110. Wu, L., C. Tang, and C. Yin. 2009. Folate-mediated solid-liquid lipid nanoparticles for paclitaxel coated poly(ethylene glycol). *Drug Dev Ind.Pharm.*
111. Wissing, S. A., O. Kayser, and R. H. Muller. 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev* 56:1257-1272.
112. Muller, R. H., R. D. Petersen, A. Hommoss, and J. Pardeike. 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv.Drug Deliv.Rev* 59:522-530.
113. Pardeike, J., A. Hommoss, and R. H. Muller. 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 366:170-184.
114. Schafer-Korting, M., W. Mehnert, and H. C. Korting. 2007. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv.Drug Deliv.Rev* 59:427-443.
115. Jennings, V., and S. H. Gohla. 2001. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J Microencapsul.* 18:149-158.
116. Yang, S., J. Zhu, Y. Lu, B. Liang, and C. Yang. 1999. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res* 16:751-757.
117. Constantinides, P. P., M. V. Chaubal, and R. Shorr. 2008. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv.Drug Deliv.Rev* 60:757-767.
118. Joshi, M. D., and R. H. Muller. 2008. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm.*

119. Attama, A. A., S. Reichl, and C. C. Muller-Goymann. 2009. Sustained release and permeation of timolol from surface-modified solid lipid nanoparticles through bioengineered human cornea. *Curr. Eye Res* 34:698-705.
120. Kalam, M. A., Y. Sultana, A. Ali, M. Aqil, A. K. Mishra, and K. Chuttani. 2009. Preparation, characterization, and evaluation of gatifloxacin loaded solid lipid nanoparticles as colloidal ocular drug delivery system. *J Drug Target*.
121. Shen, J., M. Sun, Q. Ping, Z. Ying, and W. Liu. Incorporation of liquid lipid in lipid nanoparticles for ocular drug delivery enhancement. *Nanotechnology* 21:025101.
122. Abdelbary, G., and R. H. Fahmy. 2009. Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization. *Aaps Pharmscitech* 10:211-219.
123. Sznitowska, M., M. Gajewska, S. Janicki, A. Radwanska, and G. Lukowski. 2001. Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur J Pharm Biopharm*. 52:159-163.
124. Bi, R., W. Shao, Q. Wang, and N. Zhang. 2009. Solid lipid nanoparticles as insulin inhalation carriers for enhanced pulmonary delivery. *J Biomed Nanotechnol*. 5:84-92.
125. Yang, W., J. Tam, D. A. Miller, J. Zhou, J. T. McConville, K. P. Johnston, and R. O. Williams, III. 2008. High bioavailability from nebulized itraconazole nanoparticle dispersions with biocompatible stabilizers. *Int J Pharm* 361:177-188.
126. Westesen, K. 2000. Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems - expectations and reality. *Colloid and Polymer Science* 278:608-618.
127. Pandey, R., and G. K. Khuller. 2005. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 85:227-234.
128. Rudolph, C., U. Schillinger, A. Ortiz, K. Tabatt, C. Plank, R. H. Muller, and J. Rosenecker. 2004. Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharm Res* 21:1662-1669.
129. Chithrani, B. D., and W. C. Chan. 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*. 7:1542-1550.
130. Chithrani, B. D., J. Stewart, C. Allen, and D. A. Jaffray. 2009. Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. *Nanomedicine* 5:118-127.
131. Takenaka, S., E. Karg, W. G. Kreyling, B. Lentner, W. Moller, M. Behnke-Semmler, L. Jennen, A. Walch, B. Michalke, P. Schramel, J. Heyder, and H. Schulz. 2006.

- Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal.Toxicol* 18:733-740.
132. Conner, S. D., and S. L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44.
 133. Niemeier, N. 2009. Aufnahme und Transport von Nanopartikeln in die Zelle: Mechanismus und toxikologische Aspekte.
 134. Dennekamp, M., S. Howarth, C. A. Dick, J. W. Cherrie, K. Donaldson, and A. Seaton. 2001. Ultrafine particles and nitrogen oxides generated by gas and electric cooking. *Occup. Environ Med* 58:511-516.
 135. Anderson, P. J., J. D. Wilson, and F. C. Hiller. 1989. Particle size distribution of mainstream tobacco and marijuana smoke. Analysis using the electrical aerosol analyzer. *Am Rev Respir Dis* 140:202-205.
 136. Zimmer, A. T. 2002. The influence of metallurgy on the formation of welding aerosols. *J Environ Monit.* 4:628-632.
 137. Zhu, Y., A. Eiguren-Fernandez, W. C. Hinds, and A. H. Miguel. 2007. In-cabin commuter exposure to ultrafine particles on Los Angeles freeways. *Environ Sci Technol.* 41:2138-2145.
 138. Masciangioli, T., and W. X. Zhang. 2003. Environmental technologies at the nanoscale. *Environ Sci Technol.* 37:102A-108A.
 139. Thiesen, B., and A. Jordan. 2008. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 24:467-474.
 140. Shi, Y., S. Kim, T. B. Huff, R. B. Borgens, K. Park, R. Shi, and J. X. Cheng. Effective repair of traumatically injured spinal cord by nanoscale block copolymer micelles. *Nat Nanotechnol.* 5:80-87.
 141. Jagadeesan, D., and M. Eswaramoorthy. Functionalized carbon nanomaterials derived from carbohydrates. *Chem Asian J* 5:232-243.
 142. Lay, C. L., H. Q. Liu, H. R. Tan, and Y. Liu. Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graft-carbon nanotubes for potent cancer therapeutics. *Nanotechnology* 21:065101.
 143. Poland, C. A., R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W. A. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. Macnee, and K. Donaldson. 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 3:423-428.
 144. Malarkey, E. B., and V. Parpura. Carbon nanotubes in neuroscience. *Acta Neurochir. Suppl* 106:337-341.
 145. Geiser, M., B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schurch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, H. V. Im, J. Heyder, and P. Gehr. 2005. Ultrafine particles cross cellular

- membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 113:1555-1560.
146. Borm, P. J., D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit, and E. Oberdorster. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 3:11.
147. Schulz, H. 2006. Fine particulate matter - a health hazard for lungs and other organs? *Pneumologie* 60:611-615.
148. Lahl, U., and W. Steven. 2005. Extremely fine dust -- a challenge in health care policy. *Pneumologie* 59:704-714.
149. Noro, R., A. Gemma, S. Kosaihira, Y. Kokubo, M. Chen, M. Seike, K. Kataoka, K. Matsuda, T. Okano, Y. Minegishi, A. Yoshimura, and S. Kudoh. 2006. Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation. *BMC Cancer* 6:277.
150. Gielen, V., S. L. Johnston, and M. R. Edwards. Azithromycin induces anti-viral responses in bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.*
151. Sayes, C. M., K. L. Reed, and D. B. Warheit. 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci* 97:163-180.
152. Corsini, E., M. Mitjans, V. Galbiati, L. Lucchi, C. L. Galli, and M. Marinovich. 2009. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol In Vitro* 23:789-796.
153. Henjakovic, M., K. Sewald, S. Switalla, D. Kaiser, M. Muller, T. Z. Veres, C. Martin, S. Uhlig, N. Krug, and A. Braun. 2008. Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicol Appl Pharmacol* 231:68-76.
154. Goris, K., S. Uhlenbruck, C. Schwegmann-Wessels, W. Kohl, F. Niedorf, M. Stern, M. Hewicker-Trautwein, R. Bals, G. Taylor, A. Braun, G. Bicker, M. Kietzmann, and G. Herrler. 2009. Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. *J Virol* 83:1962-1968.
155. Fernandes, C. A., and R. Vanbever. 2009. Preclinical models for pulmonary drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6:1231-1245.
156. Trifilieff, A., F. Baur, and J. R. Fozard. 2009. Role of sphingosine-1-phosphate (S1P) and the S1P(2) receptor in allergen-induced, mast cell-dependent contraction of rat lung parenchymal strips. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380:303-309.
157. Morin, C., S. Proteau, E. Rousseau, and J. Brayden. 2005. Organ-cultured airway explants: a new model of airway hyperresponsiveness. *Exp Lung Res* 31:719-744.

158. Catania, J. M., A. M. Pershing, and A. J. Gandolfi. 2007. Precision-cut tissue chips as an in vitro toxicology system. *Toxicol In Vitro* 21:956-961.
159. Komori, K., J. Nada, M. Nishikawa, H. Notsu, T. Tatsuma, and Y. Sakai. 2009. Simultaneous evaluation of toxicities using a mammalian cell array chip prepared by photocatalytic lithography. *Anal Chim. Acta* 653:222-227.
160. Trotta, M., S. Morel, and M. R. Gasco. 1997. Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from O/W microemulsions. *Pharmazie* 52:50-53.
161. Schubert, M. A., and C. C. Muller-Goymann. 2003. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles--evaluation of the method and process parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 55:125-131.
162. Chorny, M., I. Fishbein, H. D. Danenberg, and G. Golomb. 2002. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J Control Release* 83:389-400.
163. Cortesi, R., E. Esposito, G. Luca, and C. Nastruzzi. 2002. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* 23:2283-2294.
164. Lippacher, A., R. H. Muller, and K. Mader. 2004. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. *Eur J Pharm Biopharm.* 58:561-567.
165. Harms, M. 2008. Röntgenuntersuchungen an kolloidalen Arzneiformen am Beispiel von: Oberflächenmodifizierten Lipidnanopartikeln und Quil A-Assoziaten. Technische Universität Braunschweig, Dissertation. 129.
166. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223:77-92.
167. Darzynkiewicz, Z., X. Li, and J. Gong. 1994. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol* 41:15-38.
168. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
169. Borenfreund, E., and J. A. Puerner. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 24:119-124.
170. Martin, C., S. Uhlig, and V. Ullrich. 1996. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J* 9:2479-2487.
171. de Haar, C., I. Hassing, M. Bol, R. Bleumink, and R. Pieters. 2005. Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model. *Toxicol Sci* 87:409-418.

172. Koike, E., H. Takano, K. I. Inoue, R. Yanagisawa, M. Sakurai, H. Aoyagi, R. Shinohara, and T. Kobayashi. 2008. Pulmonary exposure to carbon black nanoparticles increases the number of antigen-presenting cells in murine lung. *Int J Immunopathol.Pharmacol* 21:35-42.
173. Hoymann, H. G. 2006. New developments in lung function measurements in rodents. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 2:5-11.
174. Hoymann, H. G. 2007. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *J Pharmacol Toxicol Methods* 55:16-26.
175. Cannizzaro, V., L. J. Berry, G. R. Zosky, D. J. Turner, Z. Hantos, and P. D. Sly. 2009. Impact of supplemental oxygen in mechanically ventilated adult and infant mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 165:61-66.
176. Han, F., and K. P. Strohl. 2000. Inheritance of ventilatory behavior in rodent models. *Respir Physiol* 121:247-256.
177. Raabe, O. G., M. A. Al-Bayati, S. V. Teague, and A. Rasolt. 1988. Regional Deposition of Inhaled Monodisperse Coarse and Fine Aerosol Particles in Small Laboratory Animals. *Ann Occup Hyg* 32:53-63.
178. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
179. Kittel, B., C. Ruehl-Fehlert, G. Morawietz, J. Klapwijk, M. R. Elwell, B. Lenz, M. G. O'Sullivan, D. R. Roth, and P. F. Wadsworth. 2004. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol* 55:413-431.
180. Maronpot, R., G. Boorman, and B. Gaul. 1999. Pathology of the mouse. Cache River Press, Vienna, IL, USA. 293-332.
181. Renne, R., A. Brix, J. Harkema, R. Herbert, B. Kittel, D. Lewis, T. March, K. Nagano, M. Pino, S. Rittinghausen, M. Rosenbruch, P. Tellier, and T. W"hrmann. 2009. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract *Toxicologic Pathology*.
182. Choi, S. J., J. M. Oh, and J. H. Choy. 2009. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *J Inorg.Biochem* 103:463-471.
183. Gokce, E. H., G. Sandri, M. C. Bonferoni, S. Rossi, F. Ferrari, T. Guneri, and C. Caramella. 2008. Cyclosporine A loaded SLNs: evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *Int J Pharm* 364:76-86.
184. M"ller, R. H., and S. Lucks. 1996. Arzneistofftr"ger aus festen Lipidteilchen (feste Lipidnanosph"ren) (SLN)), European Patent 0605497.

185. Scholer, N., H. Hahn, R. H. Muller, and O. Liesenfeld. 2002. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm* 231:167-176.
186. Weyenberg, W., P. Filev, P. D. Van den, J. Vandervoort, K. De Smet, P. Sollie, and A. Ludwig. 2007. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *Int J Pharm* 337:291-298.
187. Schubert, M. A. 2005. Development and characterisation of surface-modified lipid nanoparticles for protein delivery. Technische Universität Braunschweig, Dissertation. 125.
188. Terletskaia-Ladwig, E., S. Meier, R. Hahn, M. Leinmuller, F. Schneider, and M. Enders. 2008. A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR. *J Med Microbiol* 57:1000-1006.
189. Yuan, H., J. Miao, Y. Z. Du, J. You, F. Q. Hu, and S. Zeng. 2008. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *Int J Pharm* 348:137-145.
190. Brandenberger, C., B. Rothen-Rutishauser, F. Blank, P. Gehr, and C. Muhlfeld. 2009. Particles induce apical plasma membrane enlargement in epithelial lung cell line depending on particle surface area dose. *Respir Res* 10:22.
191. Duffin, R., L. Tran, D. Brown, V. Stone, and K. Donaldson. 2007. Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal Toxicol* 19:849-856.
192. Monteiller, C., L. Tran, W. MacNee, S. Faux, A. Jones, B. Miller, and K. Donaldson. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* 64:609-615.
193. Singh, S., T. Shi, R. Duffin, C. Albrecht, D. van Berlo, D. Hohr, B. Fubini, G. Martra, I. Fenoglio, P. J. Borm, and R. P. Schins. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 222:141-151.
194. Morin, J. P., F. Fouquet, C. Monteil, E. Le Prieur, E. Vaz, and F. Dionnet. 1999. Development of a new in vitro system for continuous in vitro exposure of lung tissue to complex atmospheres: application to diesel exhaust toxicology. *Cell Biol Toxicol* 15:143-152.

195. Ngamwongsatit, P., P. P. Banada, W. Panbangred, and A. K. Bhunia. 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods* 73:211-215.
196. Le Prieur, E., E. Vaz, A. Bion, F. Dionnet, and J. P. Morin. 2000. Toxicity of diesel engine exhausts in an in vitro model of lung slices in biphasic organotypic culture: induction of a proinflammatory and apoptotic response. *Arch Toxicol* 74:460-466.
197. Bischoff, D. S., J. H. Zhu, N. S. Makhijani, and D. T. Yamaguchi. 2005. KC chemokine expression by TGF-beta in C3H10T1/2 cells induced towards osteoblasts. *Biochem Biophys. Res Commun.* 326:364-370.
198. Driscoll, K. E., J. M. Carter, D. G. Hassenbein, and B. Howard. 1997. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect.* 105 Suppl 5:1159-1164.
199. Tian, X., H. Tao, J. Brisolara, J. Chen, R. J. Rando, and G. W. Hoyle. 2008. Acute lung injury induced by chlorine inhalation in C57BL/6 and FVB/N mice. *Inhal. Toxicol* 20:783-793.
200. Rich, E. A., J. R. Panuska, R. S. Wallis, C. B. Wolf, M. L. Leonard, and J. J. Ellner. 1989. Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 139:1010-1016.
201. Ishikado, A., Y. Nishio, K. Yamane, A. Mukose, K. Morino, Y. Murakami, O. Sekine, T. Makino, H. Maegawa, and A. Kashiwagi. 2009. Soy phosphatidylcholine inhibited TLR4-mediated MCP-1 expression in vascular cells. *Atherosclerosis*.
202. Kuronuma, K., H. Mitsuzawa, K. Takeda, C. Nishitani, E. D. Chan, Y. Kuroki, M. Nakamura, and D. R. Voelker. 2009. Anionic Pulmonary Surfactant Phospholipids Inhibit inflammatory responses from Alveolar Macrophages and U937 Cells by Binding the Lipopolysaccharide Interacting Proteins CD14 and MD2. *J Biol Chem*.
203. Sakakima, Y., A. Hayakawa, and A. Nakao. 2009. Phosphatidylcholine induces growth inhibition of hepatic cancer by apoptosis via death ligands. *Hepatogastroenterology* 56:481-484.
204. Treede, I., A. Braun, R. Sparla, M. Kuhnel, T. Giese, J. R. Turner, E. Anes, H. Kulaksiz, J. Fullekrug, W. Stremmel, G. Griffiths, and R. Eehalt. 2007. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 282:27155-27164.
205. Lam, C. W., J. T. James, R. McCluskey, and R. L. Hunter. 2004. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci* 77:126-134.
206. Dasenbrock, C., L. Peters, O. Creutzenberg, and U. Heinrich. 1996. The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicol Lett.* 88:15-21.

207. Wittmaack, K. 2007. In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what? *Environ Health Perspect.* 115:187-194.
208. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster. 2007. Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. *Environ Health Perspect.* 115:A290.
209. Sager, T. M., C. Kommineni, and V. Castranova. 2008. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol* 5:17.
210. Warheit, D. B., K. L. Reed, and C. M. Sayes. 2009. A role for nanoparticle surface reactivity in facilitating pulmonary toxicity and development of a base set of hazard assays as a component of nanoparticle risk management. *Inhal. Toxicol* 21:61-67.
211. Stoeger, T., O. Schmid, S. Takenaka, and H. Schulz. 2007. Inflammatory response to TiO₂ and carbonaceous particles scales best with BET surface area. *Environ Health Perspect.* 115:A290-A291.
212. Kristl, J., K. Teskac, C. Caddeo, Z. Abramovic, and M. Sentjurc. 2009. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *Eur J Pharm Biopharm* 73:253-259.
213. Matthaus, C., A. Kale, T. Chernenko, V. Torchilin, and M. Diem. 2008. New ways of imaging uptake and intracellular fate of liposomal drug carrier systems inside individual cells, based on Raman microscopy. *Mol Pharm* 5:287-293.
214. Nam, H. Y., S. M. Kwon, H. Chung, S. Y. Lee, S. H. Kwon, H. Jeon, Y. Kim, J. H. Park, J. Kim, S. Her, Y. K. Oh, I. C. Kwon, K. Kim, and S. Y. Jeong. 2009. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J Control Release* 135:259-267.
215. Wan, F., J. You, Y. Sun, X. G. Zhang, F. D. Cui, Y. Z. Du, H. Yuan, and F. Q. Hu. 2008. Studies on PEG-modified SLNs loading vinorelbine bitartrate (I): preparation and evaluation in vitro. *Int J Pharm* 359:104-110.
216. Shukla, D., S. Chakraborty, S. Singh, and B. Mishra. 2009. Doxofylline: a promising methylxanthine derivative for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin.Pharmacother.* 10:2343-2356.
217. Kristl, J., K. Teskac, M. Milek, and I. Mlinaric-Rascan. 2008. Surface active stabilizer tyloxapol in colloidal dispersions exerts cytostatic effects and apoptotic dismissal of cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 232:218-225.
218. Teskac, K., and J. Kristl. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm* 390:61-69.
219. Almeida, P. F., A. Pokorny, and A. Hinderliter. 2005. Thermodynamics of membrane domains. *Biochim.Biophys.Acta* 1720:1-13.

220. Swanson, J. A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:639-649.
221. Schubert, M. A., B. C. Schicke, and C. C. Muller-Goymann. 2005. Thermal analysis of the crystallization and melting behavior of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Int J Pharm* 298:242-254.
222. Schubert, M. A., and C. C. Muller-Goymann. 2005. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur J Pharm Biopharm* 61:77-86.
223. Schubert, M. A., M. Harms, and C. C. Muller-Goymann. 2006. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Eur J Pharm Sci* 27:226-236.
224. Bi, R., W. Shao, Q. Wang, and N. Zhang. 2009. Solid lipid nanoparticles as insulin inhalation carriers for enhanced pulmonary delivery. *J Biomed Nanotechnol* 5:84-92.
225. Varshosaz, J., M. Tabbakhian, and M. Y. Mohammadi. 2009. Formulation and optimization of solid lipid nanoparticles of buspirone HCl for enhancement of its oral bioavailability. *J Liposome Res*.
226. Manjunath, K., J. S. Reddy, and V. Venkateswarlu. 2005. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27:127-144.
227. Gallarate, M., M. Trotta, L. Battaglia, and D. Chirio. 2008. Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation. *J Microencapsul*:1-9.
228. Kim, H. R., I. K. Kim, K. H. Bae, S. H. Lee, Y. Lee, and T. G. Park. 2008. Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA. *Mol Pharm* 5:622-631.
229. Lee, M. K., S. J. Lim, and C. K. Kim. 2007. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 28:2137-2146.
230. Liu, J., T. Gong, C. Wang, Z. Zhong, and Z. Zhang. 2007. Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization. *Int J Pharm* 340:153-162.
231. Zhang, Y., J. Zhu, Y. Tang, X. Chen, and Y. Yang. 2009. The preparation and application of pulmonary surfactant nanoparticles as absorption enhancers in insulin dry powder delivery. *Drug Dev Ind. Pharm*.
232. Li, S., B. Zhao, F. Wang, M. Wang, S. Xie, S. Wang, C. Han, L. Zhu, and W. Zhou. 2009. Yak interferon-alpha loaded solid lipid nanoparticles for controlled release. *Res Vet. Sci*.

233. Yang, W., K. P. Johnston, and R. O. Williams, 3rd. Comparison of bioavailability of amorphous versus crystalline itraconazole nanoparticles via pulmonary administration in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 75:33-41.
234. Chattopadhyay, P., B. Y. Shekunov, D. Yim, D. Cipolla, B. Boyd, and S. Farr. 2007. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Adv. Drug Deliv. Rev* 59:444-453.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLSM	Konfokales Laserscanning-Mikroskop
COPD	Chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung
DC	Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EthD-1	Ethidium-Homodimer 1
FCS	Fötales Kälberserum
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
LDH	Laktatdehydrogenase
LM	Lipidmatrix
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

MIP	Inflammatorisches Makrophagen-Protein (<i>Macrophage inflammatory protein</i>)
MMAD	Massenmediandurchmesser (<i>Mass Median Aerodynamic Diameter</i>)
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
n	Anzahl der Versuche
NF-κB	Kernfaktor Kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
NP	Nanopartikel
NRT	Neutralrot-Test
OD	Optische Dichte
P90G	Phospholipon 90G
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Waschlösung
PCLS	Präzisionslungenschnitte (<i>precision-cut lung slices</i>)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PFA	Paraformaldehyd
PLA	Polymilchsäure (<i>polylactic acid</i>)
PLGA	Kopolymer [<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>]
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RP	<i>Reversed phase</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S154	Softisan 154
SAXD	Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (<i>small-angle X-ray diffraction</i>)
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SIT	Spezifische Immuntherapie
SLN	Feste Lipidnanopartikel (<i>solid lipid nanoparticles</i>)
Tab.	Tabelle
θ	Halber Beugungswinkel

Abkürzungsverzeichnis

Th2-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
WAXD	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (<i>wide-angle X-ray diffraction</i>)
WST-1	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz 1
z-average	Intensitätsgewichteter, mittlerer Teilchendurchmesser (PCS)

Außerdem wurden die Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der humanen Lunge	2
Abbildung 2: Endozytotische Aufnahmewege	19
Abbildung 3: Hochdruckhomogenisator	29
Abbildung 4: Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Nanosuspensionen	31
Abbildung 5: Vivaspin Zentrifugalkonzentrator	37
Abbildung 6: Farbreaktion des MTT-Tests	44
Abbildung 7: Tissue Slicer und Präzisionslungenschnitte	48
Abbildung 8: Farbreaktion des WST -1 Tests	50
Abbildung 9: Aerosolgenerierungsanlage	55
Abbildung 10: Repräsentative grafische Auswertung einer Impaktormessung	57
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Studiendesigns	58
Abbildung 12: Beispiel eines nach Pappenheim gefärbten Zytospots von BAL Zellen	63
Abbildung 13: <i>in vitro</i> : Ergebnis des MTT- und NR-Tests	68
Abbildung 14: <i>in vitro</i> : Quantifizierung der IL-8 Sekretion	69
Abbildung 15: <i>ex vivo</i> : Ergebnis des WST-1 Tests	70
Abbildung 16: <i>ex vivo</i> : Repräsentative 3D-Bilder von PCLS nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von SLN30	71
Abbildung 17: <i>ex vivo</i> : Quantitative Analyse der Calcein AM/EthD-1-Färbung in PCLS	72
Abbildung 18: <i>ex vivo</i> : Quantifizierung der KC Sekretion	73
Abbildung 19: <i>ex vivo</i> : Quantifizierung der TNF- α	74
Abbildung 20: <i>in vivo</i> : LDH-Aktivität in der BALF an den verschiedenen Analysezeitpunkten	76
Abbildung 21: <i>in vivo</i> : Gesamtproteingehalt in der BALF an den verschiedenen Analysezeitpunkten	77
Abbildung 22: <i>in vivo</i> : KC Konzentration in der BALF an den verschiedenen Analysezeitpunkten	79
Abbildung 23: <i>in vivo</i> : TNF- α Konzentration in der BALF an den verschiedenen Analysezeitpunkten	80

Abbildung 24: <i>in vivo</i> : IL-6 Konzentration in der BALF an den verschiedenen Analysezeitpunkten	81
Abbildung 25: <i>in vivo</i> : Gesamtzellzahl in der BALF an den verschiedenen Analysezeitpunkten	83
Abbildung 26: <i>in vivo</i> : Prozentualer Makrophagenanteil der BALF Gesamtzellzahl an den verschiedenen Analysezeitpunkten	84
Abbildung 27: <i>in vivo</i> : Prozentualer Neutrophiler Granulozytenanteil der BAL Gesamtzellzahl an den verschiedenen Analysezeitpunkten	85
Abbildung 28: <i>in vivo</i> : Prozentualer Lymphozytenanteil der BAL Gesamtzellzahl an den verschiedenen Analysezeitpunkten	86
Abbildung 29: <i>in vivo</i> : Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von HE - Färbungen des bronchiolo – alveolären Gewebes	88
Abbildung 30: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der erstarrten Lipidmatrices	89
Abbildung 31: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der geschmolzenen Lipidmatrices	90
Abbildung 32: WAXD-Diffraktogramm	91
Abbildung 33: WAXD-Diffraktogramm	92
Abbildung 34: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Nanosuspensionen	93
Abbildung 35: WAXD-Diffraktogramm	94
Abbildung 36: Flourimetrische Auswertung von SLN30, SLN30Coumarin6 Nanosuspensionen und deren Filtraten	101
Abbildung 37: Repräsentative Bilder von humanen alveolären Epithelzellen und murinen Makrophagen nach 6 h Inkubation mit markierten SLN	103
Abbildung 38: Repräsentative Darstellung aufgenommener SLN durch Alveolarmakrophagen	104
Abbildung 39: Repräsentative Darstellung aufgenommener SLN durch dendritische Zellen	105
Abbildung 40: 3D-Rekonstruktion von Alveolarmakrophagen mit aufgenommenen SLN	106
Abbildung 41: Lymphozyten aus Lymphknoten, die SLN aufgenommen haben	107

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 10: anatomische und physiologische Unterschiede zwischen humaner und muriner Lunge	5
Tabelle 2: Bauteile und deren Funktion der Aerosolgenerierungsanlage	55
Tabelle 3: Übersicht über die Gruppeneinteilung und Behandlung der Inhalationsstudie	59
Tabelle 4: Eigenschaften der SLN30 nach Markierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen	96
Tabelle 5: Eigenschaften der SLN30 nach Beladung mit Dexamethason	97
Tabelle 6: Eigenschaften der SLN30 nach Sterilisation mit Gammastrahlen	97
Tabelle 7: Eigenschaften der SLN30 nach verschiedenen Lagerungszeitpunkten	98
Tabelle 8: Eigenschaften der SLN30 nach der Herstellung mit zwei unterschiedlichen Homogenisatoren	99
Tabelle 9: Eigenschaften der SLN30 nach Resuspendierung des SLN30 Aerosols in 3 % Solutol	100

7.5 Weitere Veröffentlichungen

Publikationen als Koautor

Schleh, C., Erpenbeck, V.J., Winkler, C., Lauenstein, H.D., **Nassimi, M.**, Braun, A., Krug, N., Hohlfeld, J.M. Allergen particle binding by human primary bronchial epithelial cells is modulated by surfactant protein D

Respiratory Research 22;11:83 (2010).

Schleh, C., Mühlfeld, C., Pulskamp, K., Schmiedl, A., **Nassimi, M.**, Lauenstein, H.D., Braun, A., Krug, N., Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M. The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure

Respiratory Research 30;10:90 (2009).

Fuchs, B., Knothe, S., Rochlitzer, S., **Nassimi, M.**, Greweling, M., Lauenstein, H.D., Nassenstein, C., Müller, M., Ebensen, T., Dittrich, A.M., Krug, N., Guzman, C.A., Braun, A. A Toll-like receptor 2/6-agonist reduces allergic airway inflammation in chronic respiratory sensitisation to Timothy grass pollen allergens

International Archives of Allergy and Immunology 152(2):131-139 (2009).

Lauenstein, H.D., Pilzner, C., Schleh, C., **Nassimi, M.**, Golpon, H., Fischer, A., Krug, N., Welte, T., Braun, A., Quarcoo, D., Groneberg, D.A. Expression of VPAC1 in a Model of Environmental Allergic Asthma

Clinical and Experimental Allergy [accepted]

7.6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Professor Dr. Christel Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig und unter der Leitung von Privatdozent Dr. Armin Braun am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) in Hannover.

Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann & PD Dr. Armin Braun

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunologie, Allergologie und Atemwegsforschung am ITEM sowie den Kollegen von der Pharmazeutischen Technologie in Braunschweig für die gute und freundliche Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die zahlreichen Hilfestellungen und fachlichen Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich Olaf, Sabine und Emma für ihre theoretische und praktische Unterstützung, Simone für die Einführung in die PCLS-Technik, Sabine für die Hilfe bei der Kultivierung der DCs, Tibor und Frauke für die Hilfe beim Mikroskopieren, Dr. Pohlmann, Herrn Lingemann, Birthe und Sarah für die Hilfe bei den Inhalationsstudien und Katherina und Meike für ihre hilfreiche Unterstützung. Frau Jahn danke ich für die praktische Unterstützung bei den Röntgenuntersuchungen, Riem und Jan für die gute Zusammenarbeit bei der Herstellung und den Untersuchungen der Formulierungen und Carlos und Matthias für das Leben neben der Pharmazeutischen Technologie in Braunschweig.

Ich danke dem Lift-Club für die ausschweifenden wissenschaftlichen Diskussionen und die wunderbaren Jahre in Hannover.

Meiner Frau Negar danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation.

Zum Schluss danke ich meiner Familie für die liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

7.7 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Ebrahimi-Nassimi
Vorname:	Matthias
Geburtsname:	Müller
Geburtsdatum:	25.07.1980
Geburtsort:	Halberstadt
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

SCHULBILDUNG

09/1991 - 06/1999	Gymnasium Martineum Halberstadt, Abschluss: Abitur
-------------------	--

WEHRDIENST

07/1999 - 06/2000	2.Pionierbataillon 4, Regensburg
-------------------	----------------------------------

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

10/2000 - 07/2006	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Braunschweig, Abschluss: Approbation als Apotheker
-------------------	---

Seit 09/2006	Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin Hannover
--------------	---